

# **UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Microbiología I



## **TESIS DOCTORAL**

### **Diversidad genética del Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo I en Panamá**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Sara Mercedes Ahumada Ruiz**

Director

Miguel Thomson Okatsu

**Madrid, 2014**



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA I

**DIVERSIDAD GENÉTICA DEL VIRUS DE LA  
INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO 1 EN PANAMÁ**

CENTRO NACIONAL DE MICROBIOLOGÍA  
INSTITUTO DE SALUD CARLOS III  
MAJADAHONDA (MADRID)

**DOCTORANDO:** SARA MERCEDES AHUMADA RUIZ  
**DIRECTOR DE TESIS:** MIGUEL THOMSON OKATSU

## **DEDICATORIA**

***A Jesús de la Divina Misericordia,  
por fortalecer mi alma con fe y esperanza,  
gracias por iluminar cada uno de mis pasos  
y permitirme terminar esta nueva etapa en mi vida.***

***A mis tres grandes amores,  
mi madre Zoraida,  
mi hermosa angelito Sara Alexandra  
y mi esposo Alex, lo logramos.***

## **AGRADECIMIENTO**

A la Secretaria Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación y al Instituto para la Formación y Aprovechamiento de los Recursos Humanos (SENACYT-IFARHU) del Gobierno de Panamá por brindarme la beca completa para realizar estudios de doctorado en Madrid, España. Al Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III de Majadahonda, Madrid donde realice la investigación doctoral. A mi Director de Tesis el Dr. Miguel Thomson Okatsu por brindarme la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo, por todo lo que he aprendido de él a lo largo de estos años, por su apoyo, consejos y sobre todo por su bella amistad, mil gracias. Al Dr. Rafael Nájera Morrondo por permitirme realizar la investigación de tesis doctoral en la Unidad de Biología y Variabilidad de VIH. A la Dra. Lucia Pérez Álvarez por toda su colaboración y a todos mis compañeros de laboratorio con quienes compartí buenos momentos, muchos cafés, sonrisas y aprendí mucho, en especial a Mayte, Ana, Aurora, Elena, María, Cristina y Mercedes. Al Dr. Cecilio López Galíndez y la Dra. Concepción Casado de la Unidad de Virología Molecular con quienes inicie mis primeros pasos en este hermoso campo. A la Unidad de Genómica responsables de la secuenciación por aguantar mis interminables listas, gracias a Aurora de Miguel, Pablo García, Ana Parejo, Miguel y la Dra. Alicia Ballester. A todos los pacientes que gentilmente participaron de esta investigación, al personal médico y enfermeras del Departamento de Enfermedades Infecciosas de la Caja del Seguro Social y el Hospital Santo Tomás de Panamá, en especial a los doctores Iván Toala, Dario Flores, Amalia Rodríguez, Rigoberto Samaniego, Antonio Torres y Miss Esther Puga. A mis hermanos Michelle y Mario por todo su cariño y por animarme a terminar. A mi abuelita Bella y al Sr. Lalo que desde el cielo nos cuidan. A nuestros amigos españoles por brindarnos una familia lejos del hogar, a Denis, Casto, Paula, Leopoldo, Ismaira, Daniel y Farina, gracias. Finalmente a todas las personas que contribuyeron para que esta tesis fuese hoy una realidad.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>RESUMEN .....</b>	<b>2</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>11</b>
1.1. HISTORIA DEL SÍNDROME DE INMUNODEFICIENCIA ADQUIRIDA ....	11
1.2. ORIGEN Y PROPAGACIÓN DE LA EPIDEMIA DE VIH/SIDA.....	15
1.3. TAXONOMIA Y CLASIFICACIÓN .....	17
1.4. ESTRUCTURA DEL VIRIÓN.....	18
1.5. ORGANIZACIÓN DEL GENOMA.....	19
1.5.1. Genes estructurales.....	22
1.5.2. Genes reguladores y accesorios.....	25
1.6. CICLO DE REPLICACIÓN DEL VIH-1 .....	28
1.7. ETAPAS DE LA INFECCIÓN POR VIH-1 .....	37
1.8. VARIABILIDAD GENÉTICA DEL VIH-1 .....	41
1.8.1. Mutaciones .....	41
1.8.2. Recombinación genética.....	42
1.8.3. Dinámica poblacional.....	44
1.9. CLASIFICACIÓN FILOGENÉTICA DEL VIH.....	47
1.9.1. Formas recombinantes .....	53
1.9.1.1. Formas recombinantes circulantes .....	53
1.9.1.2. Formas recombinantes únicas.....	55
1.9.2. Distribución geográfica y prevalencia de las formas genéticas del VIH-1 .....	56
1.9.3. Superinfección por VIH-1.....	59
1.10. IMPLICACIONES BIOLÓGICAS Y CLÍNICAS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE VIH-1 .....	61
1.10.1. Pruebas diagnósticas.....	61

1.10.2. Características biológicas <i>in vitro</i> .....	61
1.10.2.1. Actividad transcripcional del promotor .....	62
1.10.2.2. Utilización de correceptores.....	62
1.10.2.3. Capacidad replicativa <i>in vitro</i> .....	63
1.10.3. Biología viral <i>in vivo</i> .....	63
1.10.3.1. Carga viral .....	63
1.10.3.2. Progresión clínica .....	64
1.10.3.3. Transmisión .....	64
1.10.4. Correlaciones de subtipos de VIH-1 con susceptibilidad a respuestas inmunes .....	65
1.11. FÁRMACOS ANTIRRETROVIRALES.....	67
1.11.1. Resistencia a fármacos ARV .....	74
1.11.2. Detección de resistencias .....	81
1.12. EPIDEMIOLOGÍA MUNDIAL DE VIH-1 .....	85
1.13. SITUACIÓN ACTUAL DE LA EPIDEMIA DE VIH/SIDA EN PANAMÁ ....	92
1.14. INTRODUCCIÓN A LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS FILOGENÉTICO ...	99
1.14.1. Modelos de sustitución de nucleótidos .....	102
1.14.2. Estructura de un árbol filogenético.....	103
1.14.3. Métodos de detección de recombinación genética .....	105
1.14.4. Métodos de datación molecular .....	107
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>109</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>111</b>
3.1. Muestras de pacientes infectados por VIH-1 .....	111
3.2. Separación de plasma y extracción de ARN .....	112
3.3. Amplificación parcial de los genes <i>gag</i> , <i>env</i> y <i>pol</i> .....	112
3.3.1. Amplificación del gen <i>gag</i> (p17).....	112

3.3.2. Amplificación del gen <i>env</i> (C2-C4).....	113
3.3.3. Amplificación del gen <i>pol</i> (PR-TI).....	114
3.4. Purificación de los productos de PCR .....	114
3.5. Secuenciación .....	116
3.6. Corrección, ensamblaje y alineamiento de las secuencias .....	118
3.7. Clonaje de los productos de PCR .....	119
3.8. Amplificación y secuenciación del genoma completo del VIH-1 .....	120
3.9. Análisis filogenéticos .....	125
3.9.1. Construcción de árboles filogenéticos .....	125
3.9.2. Análisis de recombinación .....	126
3.10. Análisis de datación molecular .....	127
3.11. Análisis de resistencia a medicamentos antiretrovirales .....	128
3.12. Análisis estadístico .....	129
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>131</b>
4.1. Análisis filogenético de las secuencias de los genes <i>gag</i> , <i>env</i> y <i>pol</i> .....	131
4.2. Datación molecular del origen de los <i>clusters</i> identificados en PR-TI .....	143
4.3. Análisis filogenético de las secuencias de los genomas completos .....	144
4.4. Análisis de resistencia a medicamentos antiretrovirales .....	171
<b>5. DISCUSIÓN .....</b>	<b>174</b>
5.1. Análisis filogenético de las secuencias de los genes <i>gag</i> , <i>env</i> y <i>pol</i> .....	174
5.2. Análisis filogenético de las secuencias de los genomas completos .....	180
5.3. Análisis de resistencia a medicamentos antirretrovirales .....	185
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>191</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>194</b>

<b>8. APÉNDICE .....</b>	<b>234</b>
<b>9. ARTÍCULOS .....</b>	<b>244</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1. ESTRUCTURA DEL VIH-1 .....</b>	<b>19</b>
<b>FIGURA 2. ORGANIZACIÓN DEL GENOMA DEL VIH-1. ....</b>	<b>20</b>
<b>FIGURA 3. CICLO DE REPLICACIÓN DEL VIH-1 .....</b>	<b>28</b>
<b>FIGURA 4. ESQUEMA DE LA FUSIÓN Y ENTRADA DEL VIH-1 EN LA CÉLULA HOSPEDADORA .....</b>	<b>30</b>
<b>FIGURA 5. TRANSCRIPCIÓN INVERSA DEL ARN DE UN RETROVIRUS.....</b>	<b>33</b>
<b>FIGURA 6. CURSO CLÍNICO DE LA INFECCIÓN POR VIH-1 .....</b>	<b>38</b>
<b>FIGURA 7. GENERACIÓN DE UN RETROVIRUS RECOMBINANTE A PARTIR DE UNA INFECCIÓN DOBLE .....</b>	<b>43</b>
<b>FIGURA 8. CLASIFICACIÓN DEL VIH-1 SEGÚN EL TROPISMO CELULAR .....</b>	<b>46</b>
<b>FIGURA 9. ÁRBOL FILOGENÉTICO DE GENOMAS COMPLETOS DE VIRUS DE LOS GRUPOS M, N, O Y P DE VIH-1, SIVCPZ Y SIVGOR.....</b>	<b>49</b>
<b>FIGURA 10. ÁRBOL FILOGENÉTICO DE SECUENCIAS COMPLETAS DE VIH-1, VIH-2 Y SIVs.....</b>	<b>50</b>
<b>FIGURA 11. CLASIFICACIÓN FILOGENÉTICA DEL VIH-1 .....</b>	<b>51</b>
<b>FIGURA 12. ESTRUCTURAS DE GENOMAS DE FORMAS RECOMBINANTES CIRCULANTES DEL VIH-1 .....</b>	<b>54</b>
<b>FIGURA 13. PREVALENCIA GLOBAL DE LAS FORMAS GENÉTICAS MAYORITARIAS DEL VIH-1 .....</b>	<b>58</b>
<b>FIGURA 14. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LAS FORMAS GENÉTICAS DEL VIH-1 MÁS PREVALENTES EN EL MUNDO .....</b>	<b>59</b>
<b>FIGURA 15. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS FÁRMACOS ARV UTILIZADOS PARA EL TRATAMIENTO DE LA INFECCIÓN POR VIH.....</b>	<b>69</b>

<b>FIGURA 16.</b> PREVALENCIA POR PAÍSES DE MUTACIONES DE RESISTENCIA A FÁRMACOS ARV TRANSMITIDAS EN POBLACIÓN NAIVE .....	<b>79</b>
<b>FIGURA 17.</b> PREVALENCIA DE INFECCIÓN POR VIH-1 EN EL MUNDO .....	<b>86</b>
<b>FIGURA 18.</b> PREVALENCIA POR PAÍSES DE INFECCIÓN POR VIH-1 EN ADULTOS .....	<b>87</b>
<b>FIGURA 19.</b> CASOS ACUMULADOS DE SIDA EN PANAMÁ .....	<b>93</b>
<b>FIGURA 20.</b> CASOS ACUMULADOS DE MORTALIDAD POR SIDA EN PANAMÁ .....	<b>93</b>
<b>FIGURA 21.</b> MAPA DE LA REPÚBLICA DE PANAMÁ.....	<b>112</b>
<b>FIGURA 22.</b> PROGRAMAS INFORMÁTICOS UTILIZADOS PARA EL PROCESAMIENTO DE SECUENCIAS .....	<b>118</b>
<b>FIGURA 23.</b> ESQUEMA DE METODOLOGÍA UTILIZADA PARA AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL GENOMA COMPLETO DEL VIH-1 .....	<b>120</b>
<b>FIGURA 24.</b> ÁRBOL FILOGENÉTICO DE <i>NEIGHBOR-JOINING</i> DE SECUENCIAS DE GAG DE PANAMÁ.....	<b>132</b>
<b>FIGURA 25.</b> ÁRBOL FILOGENÉTICO DE <i>NEIGHBOR-JOINING</i> DE SECUENCIAS DE ENV DE PANAMÁ.....	<b>133</b>
<b>FIGURA 26.</b> ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE SECUENCIAS DE <i>POL</i> DE PANAMÁ .....	<b>135</b>
<b>FIGURA 27.</b> ÁRBOL FILOGENÉTICO BAYESIANO DE PR-TI DE VIRUS DEL SUBTIPO B DE PANAMÁ.....	<b>138</b>
<b>FIGURA 28.</b> ÁRBOL FILOGENÉTICO BAYESIANO DE LOS <i>CLUSTERS</i> B-PA1 Y B-PA3 .....	<b>139</b>
<b>FIGURA 29.</b> DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DEL LUGAR DE RESIDENCIA DE LOS INDIVIDUOS INFECTADOS POR SUBTIPO B EN PANAMÁ.....	<b>140</b>
<b>FIGURA 30.</b> ANÁLISIS MEDIANTE <i>BOOTSCANNING</i> DE PR-TI DE LOS VIRUS DE SUBTIPO NO B DE PANAMÁ.....	<b>141,142</b>

<b>FIGURA 31.</b> ÁRBOL FILOGENÉTICO DE MÁXIMA VEROSIMILITUD DE GENOMAS COMPLETOS DE PANAMÁ.....	<b>145,146</b>
<b>FIGURA 32.</b> ÁRBOL FILOGENÉTICO DE MÁXIMA VEROSIMILITUD DE GENOMAS COMPLETOS DE LOS <i>CLUSTERS</i> B-PA3-5 Y B-PA6 .....	<b>147,148</b>
<b>FIGURA 33.</b> ÁRBOL FILOGENÉTICO ML DE GENOMAS COMPLETOS DE VIRUS DE SUBTIPO B DE PANAMÁ Y VIRUS RELACIONADOS DE OTROS PAÍSES .....	<b>150,151</b>
<b>FIGURA 34.</b> ÁRBOLES FILOGENÉTICOS DE MÁXIMA VEROSIMILITUD DE SEGMENTOS SOLAPANTES CONSECUTIVOS DE LOS GENOMAS COMPLETOS DE VIRUS DE SUBTIPO B PANAMÁ.....	<b>153-155</b>
<b>FIGURA 35.</b> ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA EN MOSAICO DEL GENOMA COMPLETO DE PA_8 .....	<b>158-160</b>
<b>FIGURA 36.</b> ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA EN MOSAICO DEL GENOMA COMPLETO DE PA_34.....	<b>161-163</b>
<b>FIGURA 37.</b> ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA EN MOSAICO DEL GENOMA COMPLETO DE PA_203.....	<b>¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.164,165</b>
<b>FIGURA 38.</b> ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA EN MOSAICO DEL GENOMA COMPLETO DEL VIRUS DE SUBTIPO NO B PA_15.....	<b>166,167</b>
<b>FIGURA 39.</b> ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA EN MOSAICO DEL GENOMA COMPLETO DEL VIRUS DE SUBTIPO NO B PA_39 .....	<b>168-170</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>TABLA 1.</b> ESQUEMA DE LAS PROTEÍNAS ESTRUCTURALES, REGULADORAS Y ACCESORIAS DEL VIH-1 .....	<b>21</b>
<b>TABLA 2.</b> FÁRMACOS ARV APROBADOS POR LA FDA PARA EL TRATAMIENTO DE LA INFECCIÓN POR VIH .....	<b>68</b>
<b>TABLA 3.</b> PRINCIPALES MUTACIONES DE RESISTENCIA A FÁRMACOS ARV UTILIZADOS PARA EL TRATAMIENTO DE INFECCIÓN POR VIH-1 .....	<b>75,76</b>
<b>TABLA 4.</b> ESTUDIOS DE MUTACIONES DE RESISTENCIA A FÁRMACOS ARV EN LATINOAMÉRICA Y EL CARIBE. ....	<b>83,84</b>
<b>TABLA 5.</b> PREVALENCIA DE INFECCIÓN POR VIH-1 EN ADULTOS EN AMÉRICA LATINA Y EL CARIBE .....	<b>88</b>
<b>TABLA 6.</b> DISTRIBUCIÓN DE LAS FORMAS GENÉTICAS DEL VIH-1 EN MÉXICO, CENTROAMÉRICA, COLOMBIA, VENEZUELA Y EL CARIBE. ....	<b>96-98</b>
<b>TABLA 7.</b> SECUENCIA DE CEBADORES UTILIZADOS PARA LA AMPLIFICACIÓN DE SEGMENTOS PARCIALES DE LOS GENES <i>GAG</i> , <i>ENV</i> Y <i>POL</i> . ....	<b>115</b>
<b>TABLA 8.</b> CEBADORES UTILIZADOS PARA LA SECUENCIACIÓN DE <i>GAG</i> , <i>ENV</i> Y <i>POL</i> . ....	<b>117</b>
<b>TABLA 9.</b> SECUENCIA DE CEBADORES UTILIZADOS PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL GENOMA COMPLETO. ....	<b>123</b>
<b>TABLA 10.</b> SECUENCIA DE CEBADORES UTILIZADOS PARA LA SECUENCIACIÓN DEL GENOMA COMPLETO. ....	<b>124,125</b>
<b>TABLA 11.</b> MUESTRAS AMPLIFICADAS EN CADA GEN. ....	<b>131</b>
<b>TABLA 12.</b> DISTRIBUCIÓN DE LOS SIETE <i>CLUSTERS</i> FILOGENÉTICOS DEL SUBTIPO B DE PANAMÁ SEGÚN EL ÁREA GEOGRÁFICA Y FACTORES DE RIESGO. ....	<b>137</b>

<b>TABLA 13.</b> DATACIÓN MOLECULAR DEL ORIGEN DE LOS <i>CLUSTERS</i> DE SUBTIPO B DE PANAMÁ.....	<b>144</b>
<b>TABLA 14.</b> ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE FRAGMENTOS SOLAPANTES DE 3 VIRUS DE SUBTIPO B CON TOPOLOGÍA INCONGRUENTE ENTRE PR-TI Y GENOMA COMPLETO....	<b>156</b>
<b>TABLA 15.</b> MUTACIONES PRIMARIAS ASOCIADAS A RESISTENCIA FRENTE A MEDICAMENTOS ARV EN PACIENTES DE PANAMÁ.....	<b>172</b>
<b>TABLA A1 DEL APÉNDICE.</b> DATOS CLÍNICOS Y EPIDEMIOLÓGICOS DE LOS INDIVIDUOS INFECTADOS POR VIH-1 RESIDENTES EN PANAMÁ.....	<b>234-242</b>

# **RESUMEN**

## SUMMARY

### 1. INTRODUCTION

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) is the etiological agent of the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). The HIV-1 pandemic is currently one of the greatest public health problems at a global scale, with 34 million estimated HIV-1 infected people in the world at the end of 2011.

HIV-1 is classified in the family Retroviridae, genus Lentivirus. A second lentivirus, the human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2), is also the etiological agent of a minority of AIDS cases, mainly in West Africa. HIV-1 is characterized for its rapid evolution and its high genetic diversity. Phylogenetic analyses have allowed to distinguish four phylogenetic groups in HIV-1: M (main), O (outlier), N (non M, non O), and P, which derive from four independent introductions from apes in Central Africa, groups M and N from chimpanzees and groups O and P either from gorillas or from chimpanzees. Group M is the responsible for the HIV-1 pandemic and is further subdivided in nine subtypes (A-D, F-H and K), 55 circulating recombinant forms (CRFs) and multiple unique recombinant forms (URFs). The high genetic diversity of HIV-1 may have implications for the validity of diagnostic tests, the efficacy of antiretroviral drugs and development of resistance to them, pathogenesis, transmission and vaccine development.

In the Americas, subtype B is the predominant HIV-1 genetic form, although there are other genetic forms circulating in some countries, mainly in the Southern Cone, Brazil and Cuba. Subtype B probably originated around 1966 in Haiti, from where it began to spread before the emergence of the “pandemic clade”, derived from a single migration out of Haiti and comprising the great majority of subtype B viruses circulating in the world. Data on HIV-1 genetic diversity in Central America, including Panama, is scarce. Panama has an HIV-1 prevalence of 0.8%, which is the second highest in Central America, together with Guatemala. Since september 1984, when the first AIDS case was diagnosed in Panama, the cumulated number of registered cases of HIV-1 infection without AIDS clinical manifestations was 6,261 until December 2010, and those of AIDS cases were of 12,442 until September 2012, of which 8,292 have died of the disease. The main transmission route is through sexual

contact. The work of this Doctoral Thesis represents the first study on HIV-1 genetic diversity in Panama.

## **2. HYPOTHESES**

- a)** Whether in Panama subtype B is the only or predominating HIV-1 genetic form or there are other HIV-1 genetic forms circulating in the country.
- b)** Whether there are HIV-1 transmission networks in Panama, reflected in phylogenetic clusters, and, if found, whether they have correlations with epidemiological variables, such as transmission route or geographic area, and whether they originated at the beginning of the HIV-1 epidemic in Panama or more recently.
- c)** Whether the HIV-1 epidemic in Panama derives from a single or from multiple introductions, and whether the introduced viruses originated in North America, South America, the Caribbean islands, or outside of the Americas.
- d)** Whether inter- or intrasubtype recombination is detected in HIV-1 isolates identified in Panama.
- e)** Whether and how frequently HIV-1 isolates resistant to antiretroviral drugs are transmitted in Panama.

## **3. AIMS**

This Doctoral Thesis has as objective the study of HIV-1 genetic diversity in Panama, including the analysis of the distribution of subtypes, recombinant forms and intrasubtype clusters and their epidemiological correlations, the molecular dating of the origin of the identified clusters, the characterization of full-length viral genomes, with analysis of inter- and intrasubtype recombination and phylogenetic relationships with viruses from other countries, as well as the determination of the prevalence of antiretroviral drug-resistant viruses.

## **4. MATERIALS AND METHODS**

### **4.1. Samples**

A total of 163 samples from AIDS patients (n=107) and HIV-1 infected asymptomatic individuals (n=56), collected in the two largest hospitals in Panama, where analyzed. All samples were collected in 2004 or 2005.



#### **4.2. Amplification and sequencing of partial segments of *gag*, *env* and *pol* genes of HIV-1**

The amplification of partial segments of *gag* (p17), *env* (C2-C4) and *pol* (protease-reverse transcriptase, PR-RT) of HIV-1 from plasma RNA was done by reverse transcription coupled with polymerase chain reaction (PCR) followed by nested PCR. PCR products were enzymatically purified and sequenced using an automated sequencer.

#### **4.3. Amplification and sequencing of HIV-1 near full-length genomes**

Samples were selected based on the results obtained from the analyses of partial sequences. Near full-length genome amplification was done by RT-PCR followed by nested PCR in four overlapping fragments from plasma RNA. Sequencing of the four fragments was done in overlapping segments of approximately 800 nucleotides.

#### **4.4. Sequences correction, assembly and alignment**

Electroferograms were corrected and assembled using Seqman II program (DNASTAR). Sequences were aligned with Clustal X.

#### **4.5. Phylogenetic analyses**

Phylogenetic trees were built using the neighbor-joining (NJ) algorithm with MEGA, by maximum likelihood (ML) using RAxML, and by Bayesian inference using MrBayes. NJ trees were constructed using Kimura's two-parameter substitution model, with assessment of node stability by bootstrapping with 1,000 replicates. ML trees were built using the general time reversible evolutionary model with gamma-distributed among-site rate heterogeneity and a proportion of invariable sites (GTR+ $\Gamma$ +I), with assessment of node stability by bootstrapping using 100 replicates. As a general rule, a node with a bootstrap value  $\geq 70\%$  was considered to be well supported.

For construction of trees by Bayesian inference, the GTR+ $\Gamma$ +I evolutionary model was used. Two simultaneous independent runs were performed with 8 chains until convergence, as determined by a standard deviation of split frequencies  $< 0.01$ . The statistical support of the nodes was assessed by a majority-rule consensus of sampled trees, with 50% initial trees

excluded as burn-in. A node was considered to be well supported if its posterior probability was  $\geq 0.95$ .

#### **4.6. Analysis of recombination**

For analysis of inter- and intrasubtype recombination, the bootscanning method implemented in Simplot program was used. In this analysis, phylogenetic trees were built using the NJ algorithm. Intrasubtype recombination was also analyzed by construction of phylogenetic trees of partial overlapping genome fragments using ML and Bayesian methods. In these analyses, it was assumed that the detection of incongruent tree topologies between different segments of the genome indicated the presence of recombination.

#### **4.7. Molecular dating of phylogenetic clusters**

The rhythm of nucleotide substitution and the time of the most recent common ancestor (tMRCA) of clusters were estimated using PR-RT sequences with a Bayesian method implemented in BEAST program. The posterior distribution of evolutionary rhythms was estimated using alignments of subtype B sequences from the Los Alamos HIV Sequence Database and from samples processed at the HIV Biology and Variability Unit. The analyses were done employing the codon-based substitution model SRD06, the Bayesian Skyline Plot model of demographic growth, and a relaxed molecular clock with uncorrelated log normal distribution. The uncertainty in the estimations was reflected in 95% highest posterior density (95% HPD) values.

#### **4.8. Analysis of resistance to antiretroviral drugs**

PR-RT sequences were analyzed for the presence of antiretroviral (ARV) drug resistance mutations using the HIVdb program at the Stanford University's Database.

#### **4.9. Statistical analyses**

Correlations between clusters and transmission route or geographical area (East or West Panama) were assessed with Fisher's exact test.

## 5. RESULTS

### 5.1. Phylogenetic analyses of partial *gag*, *env* and *pol* sequences

One hundred and forty five (98.6%) of 147 viruses which could be amplified in at least one of the segments of *gag*, *pol* and *env* genes were of subtype B and two were intersubtype recombinants. In the Bayesian analysis of PR-RT sequences, 7 intrasubtype clusters were identified, which comprised the majority (71.6%) of subtype B viruses of Panama. Three of the clusters, including the largest one, showed geographic associations with East or West Panama, but no significant associations with transmission routes were found. The great majority of subtype B viruses branched within the pandemic clade, except 6, which branched basally to it.

### 5.2. Molecular dating of the origin of subtype B clusters

The tMRCA of six clusters comprising at least four viruses after exclusion of sequences with drug resistance mutations was estimated. The mean tMRCA was in the 1970s (range 1971-1977) in 5 clusters and in 1980 in one.

### 5.3. Phylogenetic analyses of full-length genome sequences

A total of 38 viruses, 36 of subtype B and the two intersubtype recombinants were sequenced in full-length genomes. The phylogenetic analysis of the subtype B viruses confirmed the cluster structure previously defined in PR-RT, except that two clusters identified in PR-RT grouped in a single cluster in full-length genomes and that three viruses had incongruent topologies in PR-RT and full-length genomes. These viruses were identified as intrasubtype recombinant by bootscanning and phylogenetic analyses of partial genome segments. Three of the clusters were phylogenetically related to viruses of other countries, two with viruses from South America and one with viruses from the United States and France. The analyses of the intersubtype recombinant viruses revealed that they were unique recombinant forms derived from secondary recombination of CRFs (CRF02\_AG and subsubtype A3, and CRF12\_BF and subtype B, respectively).

#### 5.4. Analysis of resistance to antiretroviral drugs

The analysis of PR-RT sequences revealed that 9.7% AIDS patients, all of them ARV drug-experienced, had mutations associated with resistance to ARV drugs. No drug resistance mutations were detected among asymptomatic HIV-1 infected individuals.

### 6. DISCUSSION

The results of this study, the first carried out on HIV-1 genetic diversity in Panama, revealed that subtype B is the predominant genetic form in the HIV-1 epidemic in this country, with the detection of only two viruses of other genetic forms, both intersubtype recombinant. These results are in agreement with those reported for other countries of Central America, Mexico and neighboring Colombia, in which the predominant HIV-1 genetic form was subtype B, with only sporadic cases of other genetic forms.

In the PR-RT fragment, 7 phylogenetic clusters were identified in subtype B, which comprised 71.6% subtype B viruses of Panama, with the largest cluster comprising 32.1% subtype B viruses. The cluster structure of subtype B viruses of Panama was confirmed in phylogenetic analyses of full-length genomes, although two clusters identified in PR-RT grouped in a single cluster in full-length genomes. Geographic correlations of three of the clusters, including the largest one, with East or West Panama were observed. Molecular dating allowed to estimate the tMRCAs of five clusters in the 1970s (1971-1977) and of one cluster in 1980. These estimates are concordant with those recently estimated for six subtype B clusters in Central American countries, whose tMRCAs were estimated in 1966 in one and in the 1970s (1971-1976) in the other five. The existence of intrasubtype phylogenetic clusters, in some cases with geographical or other epidemiological correlations, has been reported previously in other countries. These clusters may derive from multiple introductions of a genetic form or reflect the existence of multiple transmission networks in a geographical area, or both. In Panama, the estimated tMRCAs of the clusters in the 1970s or early 1980s and the phylogenetic relationship of several of them to viruses from different countries support a scenario of multiple introductions of subtype B at the beginning of the epidemic.

In PR-RT, six viruses branched outside of the pandemic clade of subtype B, similarly to the reference virus RF, of Haitian ancestry, a topology that was confirmed in the analysis of the full-length genome sequence of one virus. The most likely explanation for this topology is that these viruses derive from the initial radiation of subtype B originated in Haiti prior to the origin of the pandemic clade. The prepandemic spread of subtype B is known to have reached other Caribbean islands, but its spread to Central America has not been reported previously.

Three subtype B viruses had discordant topologies between PR-RT and full-length genome trees. These viruses were identified as intrasubtype recombinant by bootscanning and trees of partial genome segments, grouping with viruses of different clusters in different genome segments. The identification of these viruses confirms that in areas in which a single HIV-1 genetic form circulates, intrasubtype recombinant viruses are generated (as previously reported for subtype C viruses in Southern Africa) and that their detection can be facilitated by the identification and full-length genome characterization of intrasubtype clusters.

The analysis of the full-length genome sequences of both intersubtype recombinant viruses initially identified in PR-RT showed that they represent URFs derived from secondary recombination between a CRF and a subtype (CRF02\_AG and A3 subsubtype, and CRF12\_BF and subtype B, respectively). Considering that there is no evidence that these genetic forms (except subtype B) are circulating in Panama or in neighboring countries or that the individuals harboring the URFs had acquired the viruses outside of Panama, it is most probable that they were acquired through sexual contacts with individuals who traveled to Panama from outside of the region, with the most likely places of origin of the CRF02/A3 and CRF12/B viruses being West Africa and South America, respectively, where their parental genetic forms circulate.

The genotypic analysis of PR-RT sequences for ARV drug resistance revealed that 9.7% AIDS patients, all ARV drug-experienced, and none of asymptomatic individuals, had ARV drug resistance mutations. The low prevalence of ARV drug resistant viruses in Panama may derive from the relatively short time period since the generalized use of ARV therapies in the country to the time of sample collection (2004-2005). The absence of ARV drug-

resistant viruses in drug-naive individuals in this study, in contrast to studies reported in other Latin American and Caribbean countries, may also be due to the fact that the samples collected for this study did not correspond to recent infections.

## **7. CONCLUSIONS**

- 1) The HIV-1 epidemic in Panama is caused by subtype B, with only two of the studied viruses being of non-B genetic forms, both intersubtype recombinants with probable ancestries in West Africa and South America, respectively.
- 2) Most subtype B viruses of Panama group in phylogenetic clusters, which were characterized in full-length genomes, some of which have associations with geographic areas of Panama. These clusters originated in the 1970s or early 1980s, and some are phylogenetically related to viruses of other countries, suggesting the existence of multiple introductions of subtype B early in the epidemic in Panama.
- 3) Three intrasubtype B recombinant viruses were identified by analyses of full-length genome sequences.
- 4) Six viruses deriving from the preepidemic radiation of subtype B, probably originated in Haiti, were identified in Panama, one of them characterized in the full-length genome.
- 5) No ARV drug resistance mutations were detected in ARV drug-naive individuals, suggesting a low prevalence of transmitted drug resistant viruses at the time when the individuals examined in this study were infected.

## **8. PUBLICATIONS**

- 1) Ahumada-Ruiz S, Casado C, Toala-González I, Flores-Figueroa D, Rodríguez-French A, López-Galíndez C. 2008. High divergence within the major HIV type 1 subtype B epidemic in Panama. *AIDS Res Hum Retroviruses*; 24:1461-1466.
- 2) Ahumada-Ruiz S, Flores-Figueroa D, Toala-González I, Thomson MM. 2009. Analysis of HIV-1 pol sequences from Panama: identification of phylogenetic clusters within subtype B and detection of antiretroviral drug resistance mutations. *Infect Genet Evol*; 9:933-940.

# **INTRODUCCIÓN**

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. HISTORIA DEL SÍNDROME DE INMUNODEFICIENCIA ADQUIRIDA

El 5 de junio de 1981, los doctores Michael Gottlieb y Joel Weisman, del Centro de Control de Enfermedades Infecciosas de Atlanta (Center for Disease Control, CDC), publicaron un artículo en el *Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)*, en el que se describían cinco pacientes diagnosticados de un tipo de neumonía extremadamente raro causado por *Pneumocystis carinii* (actualmente *Pneumocystis jirovecii*) en varones homosexuales jóvenes en Los Ángeles (California) (21, 176, 324). Previamente a la descripción de estos casos, esta neumonía típicamente oportunista sólo se había descrito en personas inmunodeprimidas por cáncer o fármacos inmunosupresores. Los cinco pacientes presentaban infecciones previas, confirmadas en el laboratorio, por citomegalovirus (CMV) y candida en mucosas. Dos de los pacientes habían fallecido (21, 176, 324). Esta publicación pasaría a la historia como la primera en la que se describe la enfermedad conocida posteriormente como síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (176, 324).

La nueva entidad clínica fue descrita con mayor detalle por Gottlieb y sus colaboradores el 10 de diciembre del mismo año en un segundo artículo publicado en el *New England Journal of Medicine*, en el que describieron nuevos casos en varones homosexuales jóvenes en Nueva York, San Francisco y otras áreas urbanas de California (192, 324), e incluía una neoplasia de rara incidencia en los Estados Unidos y Europa, el sarcoma de Kaposi, que previamente sólo se había descrito en varones adultos de edad avanzada o inmunodeprimidos (174, 192, 324). Poco tiempo después comenzaron a diagnosticarse casos de linfadenopatía crónica y de otra neoplasia, el linfoma no Hodgkin (176). Una vez más los individuos afectados por estas patologías sufrían una severa inmunodeficiencia (192). Los análisis de poblaciones linfocitarias de los pacientes mostraron que éstos presentaban una depleción selectiva severa de linfocitos CD4<sup>+</sup> (174, 177).

Estos primeros pacientes tenían en común una serie de características: eran varones homosexuales jóvenes, de raza blanca y residentes en Los Ángeles,



Nueva York y San Francisco, lo que hizo sospechar que la enfermedad probablemente estaba causada por un agente infeccioso que se transmitía por relaciones sexuales entre varones homosexuales (174, 192). Posteriormente el número de casos fue en aumento en Estados Unidos, describiéndose casos también en Europa y África subsahariana (324).

En julio de 1983 se habían declarado en Estados Unidos 1576 casos de SIDA y se habían descrito casos en 12 países europeos. La población afectada por la enfermedad incluía a varones homosexuales, hemofílicos, usuarios de drogas intravenosas (UDIs) y receptores de transfusiones sanguíneas, lo que sugería que se trataba de una enfermedad transmisible de posible origen vírico, de transmisión sanguínea y sexual (176).

En septiembre de 1983, durante la Conferencia de *Cold Spring Harbor Laboratory* en Estados Unidos sobre virus de la leucemia humana de células T, Robert Gallo, del Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos, formuló la hipótesis de que el agente etiológico del SIDA podría ser un virus de la familia de retrovirus linfotrópicos de células T humanas (human T-lymphotropic viruses, HTLV), que incluían dos virus, el HTLV-I y el HTLV-II, descubiertos por él y su equipo de colaboradores, y que constituían los primeros retrovirus humanos conocidos (176, 241, 363, 364, 367).

Luc Montagnier y sus colaboradores, en particular Jean Claude Chermann y Françoise Barré-Sinoussi, del Instituto Pasteur de París, publicaron el 20 de mayo de 1983 en la revista *Science* el primer aislamiento de un nuevo retrovirus obtenido de la biopsia de un paciente con inflamación de los ganglios linfáticos, al que denominaron virus asociado a linfadenopatía (lymphadenopathy-associated virus, LAV) (61, 177, 306). El retrovirus identificado en París era antigénicamente distinto de los HTLV-I y II de Gallo y estaba más relacionado con los lentivirus animales (176, 177, 306). Hacia finales de 1983 los investigadores franceses estaban convencidos de que LAV era el agente etiológico del SIDA, aunque para demostrarlo era necesario establecer una correlación epidemiológica entre el virus y la enfermedad, lo cual requería el desarrollo de un test serológico. Con este objetivo, Gallo y su

equipo concentraron sus esfuerzos en el cultivo del patógeno. A finales de 1983 describieron varias líneas celulares en las que podía cultivarse el nuevo agente (368). En 1984, describieron el aislamiento del virus de 48 individuos, incluyendo pacientes con SIDA y pertenecientes a grupos de riesgo, denominándolo virus linfotrópico humano de células T tipo III (HTLV-III) (178, 306). También desarrollaron la primera prueba diagnóstica para detectar anticuerpos frente al virus en sangre mediante la cual demostraron la correlación epidemiológica entre anticuerpos frente al virus y la enfermedad. Esto permitió establecer el papel de este nuevo patógeno como agente etiológico del SIDA (177, 415, 419).

La idea de que el agente causal del SIDA fuese un retrovirus surgió en primer lugar de Robert Gallo y su grupo. Sin embargo, fueron Luc Montagnier y su equipo los primeros en aislar el virus en el laboratorio. Este último junto con investigadores del CDC publicaron en julio de 1984 un trabajo en el que concluían que LAV y HTLV-III eran el mismo virus (176). Finalmente, el 23 de mayo de 1986, el Comité Internacional de Taxonomía de Virus acordó eliminar los nombres anteriores (LAV y HTLV-III) y designarlo como virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (176, 492), que pasó a denominarse VIH-1 cuando un segundo retrovirus, denominado virus de inmunodeficiencia humana tipo 2 (VIH-2) fue aislado en 1986 de pacientes con SIDA de África occidental (177, 306).

Durante muchos años se mantuvo una fuerte disputa entre Estados Unidos y Francia por la autoría del descubrimiento del VIH. Finalmente, en el año 2008, el investigador francés Luc Montagnier y su colaboradora Françoise Barré-Sinoussi, fueron galardonados con el Premio Nobel de Medicina por dicho descubrimiento.

Desde estos primeros hallazgos hasta la actualidad han transcurrido tres décadas. Hoy sabemos que el VIH-1 infecta células del sistema inmune (principalmente linfocitos CD4<sup>+</sup> y macrófagos), causando su muerte o alterando su funcionalidad, con el consiguiente deterioro progresivo de la capacidad del sistema inmune para combatir las infecciones, y que en las etapas más

avanzadas de la infección sobreviene el SIDA, caracterizado biológicamente por un profundo deterioro de la inmunidad celular y una severa depleción de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y clínicamente por la presencia de algunas infecciones oportunistas o tipos de cáncer (177, 306, 492). También se sabe que el virus se transmite por contacto sexual (penil-vaginal y penil-anal), la transfusión de sangre o productos sanguíneos contaminados, el uso compartido de agujas, jeringuillas u otros instrumentos punzantes o cortantes y de la madre al hijo durante el embarazo, el parto y la lactancia (110, 295, 306, 483, 492). La eficiencia de la transmisión sanguínea depende de múltiples factores, como el número de partículas virales, volumen de sangre y el estado inmune del receptor. El contacto sexual (homosexual y heterosexual) es el principal modo de transmisión, siendo la transmisión heterosexual la predominante a escala global, aumentando el riesgo de transmisión con las infecciones genitales concomitantes causadas por otros patógenos (herpes, clamidia y otros) (110). La probabilidad de transmisión de la madre al hijo en ausencia de tratamiento antirretroviral durante el embarazo es del 15-30% (12, 306).

La epidemia de VIH-1/SIDA constituye en la actualidad uno de los más graves problemas de salud pública, con grandes repercusiones demográficas, sociales y económicas a nivel mundial, pero particularmente en los países en vías de desarrollo. El Programa Conjunto de Naciones Unidas sobre VIH/SIDA (ONUSIDA) estimó que a finales de 2011 había 34 millones de personas infectadas por el VIH-1 en todo el mundo, que corresponde al 0,8% de los adultos entre 15-49 años de edad, e incluyen 2,5 millones de niños menores de 15 años, estimándose en 2,5 millones las nuevas infecciones por VIH-1 y en 1,7 millones las defunciones por SIDA en ese año (18).

Hoy día, con la adecuada intervención, el acceso universal al tratamiento antirretroviral y al cuidado de los pacientes, la infección por el VIH ha dejado de ser una sentencia de muerte y ha pasado a ser una enfermedad crónica. Sin embargo, en los países en vías de desarrollo millones de pacientes carecen de acceso a este tratamiento y el SIDA sigue cobrándose gran número de vidas. Por ello es importante incidir en las campañas de prevención de conductas de alto riesgo, promoviendo el uso del preservativo, el retraso en la primera

relación sexual y la reducción en el número de parejas sexuales, que pueden tener un efecto importante en la reducción de la transmisión del VIH.

## 1.2. ORIGEN Y PROPAGACIÓN DE LA EPIDEMIA DE VIH/SIDA

Las muestras más antiguas en las que se ha documentado infección por VIH-1 del grupo M, que es el causante de la pandemia de SIDA (ver sección 1.9), datan de 1959 (526) y 1960 (514), procedentes ambas de Leopoldville (Congo Belga/República del Congo), actualmente Kinshasa, República Democrática del Congo (RDC). Worobey y colaboradores mediante análisis de reloj molecular, utilizando muestras contemporáneas y las muestras más antiguas recogidas en la RDC, estimaron el origen del grupo M hacia comienzos del siglo XX (514). Sin embargo, los primeros casos documentados de SIDA no aparecen hasta principios de la década de 1980, lo que permite deducir la existencia de un largo periodo preepidémico en el que se produjo la transmisión y diversificación genética iniciales del VIH-1. La lenta progresión de la epidemia se puede explicar porque la expansión inicial del VIH-1 se habría producido en áreas rurales aisladas de África central occidental (probablemente en la RDC) (424), coincidiendo la expansión de la epidemia fuera de estas áreas con determinados cambios socioeconómicos, como la urbanización, migraciones, aumento de la prostitución y viajes internacionales.

La emergencia del VIH y su infección en el humano tiene relación geográfica con dos diferentes virus de la inmunodeficiencia de simios (SIVs). Los SIVs pertenecen al género de los lentivirus e infectan de forma natural al menos a 40 especies diferentes de primates no humanos en África subsahariana (453). Además de a primates, los lentivirus infectan a distintas especies de felinos y ungulados (ovejas, cabras, bóvidos y caballos) (46). Los análisis filogenéticos indican que los SIVs que infectan chimpancés (SIVcpz) de la subespecie *Pan troglodytes troglodytes*, que habitan en África central occidental, originaron el grupo M del VIH-1 y los que infectan mangabeys de cara tiznada (*Cercocebus atys*), que habitan en África occidental, originaron el VIH-2 (ver sección 1.9).

La incursión del hombre en el hábitat natural de los simios africanos para su caza y su utilización como alimento para consumo humano, sugiere la

transmisión del virus a través de inóculos de sangre contaminada durante el despiece (133, 295, 424, 458). El origen zoonótico de la infección en humanos del VIH-1 y VIH-2 está apoyado también por la coincidencia geográfica entre el hábitat natural de los simios infectados con los SIVs mencionados arriba y las zonas geográficas con mayor diversidad genética de los lentivirus humanos (201, 344).

A principios de la década de 1980 aparecen de manera casi simultánea los primeros casos de SIDA en Estados Unidos, Haití y África central (306).

Los primeros casos de SIDA relacionados con África central se diagnosticaron en Europa y correspondían a individuos africanos que habían viajado a Europa o a europeos que habían estado en África. El primer caso de SIDA documentado relacionado con África corresponde a un marinero noruego que tuvo contactos sexuales con prostitutas en Camerún en 1961-2 (235).

En África la infección comenzó a extenderse desde la RDC hacia el este afectando a partir de 1983 a países como Ruanda, Burundi, Uganda, Kenia y Tanzania, y algunos años más tarde hacia África occidental, comenzando por Costa de Marfil. En África el principal factor de riesgo para la transmisión del VIH-1 parecía ser el contacto heterosexual, ya que la mayoría de los pacientes con SIDA negaron ser UDIs, tener contactos homosexuales, o haber recibido transfusiones de sangre o hemoderivados. La transmisión heterosexual también estaba apoyada por una proporción de casos de SIDA similar entre los dos sexos, la alta prevalencia entre prostitutas, y la asociación con mayor número de parejas heterosexuales y con contactos con prostitutas (306, 324).

En Estados Unidos, los primeros casos de SIDA se documentaron en 1981, afectando al grupo de hombres que tienen relaciones sexuales con hombres (HSH). Además, se identificaron los primeros casos de SIDA entre inmigrantes procedentes de Haití, entre los que el principal factor de riesgo parecía ser el contacto heterosexual, ya que la mayoría de los pacientes negaron ser UDIs y tener contactos homosexuales (306, 324). En análisis retrospectivos, las primeras muestras seropositivas para VIH-1 en dicho país se remontan a 1978.

En Europa occidental, la epidemia de SIDA comenzó en 1982 afectando también al grupo de HSH, aunque hay casos esporádicos documentados desde 1980. La epidemia incipiente del SIDA entre HSH en Europa estaba relacionada con la de Estados Unidos, lo cual se deducía de la correlación entre los primeros casos en homosexuales y contactos sexuales en las ciudades afectadas por la epidemia en Norteamérica (324).

Al igual que en Europa occidental, los primeros casos de SIDA en Sudamérica datan de comienzos de la década de 1980. Desde finales de dicha década y durante la década de 1990, la infección por VIH-1 se convirtió en pandémica, propagándose rápidamente en nuevas áreas como India, el sureste de Asia, África del sur, China y la antigua Unión Soviética.

Las características epidemiológicas del SIDA son diferentes entre los distintos países, de acuerdo con las vías de transmisión predominantes. En Estados Unidos, Europa occidental y Australia, la epidemia inicial afectó principalmente a varones homosexuales. En África subsahariana, Latinoamérica y el Caribe, el principal factor de riesgo son las relaciones heterosexuales. En el sudeste de Asia la epidemia comenzó a finales de la década de los ochenta y se extiende con gran rapidez por transmisión heterosexual y entre UDIs. En los países de la antigua Unión Soviética y en China, el VIH comenzó a expandirse en la década de los noventa y la transmisión es principalmente por el intercambio del material utilizado para la inyección entre UDIs (324, 468, 471).

### 1.3. TAXONOMIA Y CLASIFICACIÓN

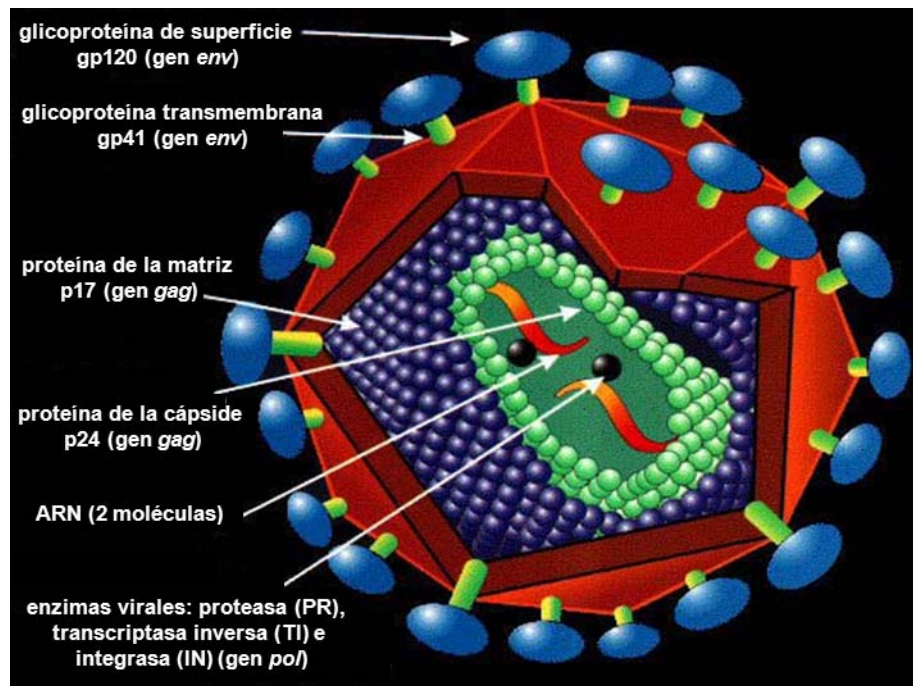
Según su morfología, estructura genética y secuencia de nucleótidos, el VIH se clasifica en la familia *Retroviridae*, género *Lentivirus* y se divide en dos tipos: virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) y virus de la inmunodeficiencia humana tipo 2 (VIH-2), que comparten un 40-50% de homología genética y una organización genómica similar. De ellos, el VIH-1 es el responsable de la pandemia del SIDA (135, 183, 492). Los miembros del género *lentivirus* se caracterizan porque son virus exógenos, de transmisión vertical y horizontal, no oncogénicos, con tropismo por linfocitos T CD4<sup>+</sup> o macrófagos, con capacidad de infectar e integrarse en células que no se están

dividiendo y evadir la respuesta del sistema inmune, produciendo infecciones persistentes, que dan lugar a enfermedades con periodos de incubación largos (135).

El genoma de los retrovirus presenta cuatro características únicas entre los virus: **1)** genoma de ARN diploide, **2)** son los únicos virus de ARN cuyo genoma viral se genera gracias a la maquinaria transcripcional de la célula, **3)** después de la infección el genoma viral de ARN no sirve directamente como ARN mensajero; y **4)** requieren de un ARN de transferencia celular específico para la síntesis de ADN (183, 492).

#### **1.4. ESTRUCTURA DEL VIRIÓN**

Los viriones maduros tienen una morfología esférica de entre 100 y 120 nm de diámetro, cuya envoltura externa es una bicapa fosfolipídica que procede de la membrana plasmática de la célula infectada, en la cual hay aproximadamente 14 espículas insertadas, cada una de las cuales está formada por la glicoproteína de superficie (gp120) y la glicoproteína transmembrana (gp41), ambas asociadas no covalentemente a la superficie del virión, formando un complejo trimérico (275, 522, 525). Por dentro de la membrana, se encuentra la matriz, que está compuesta de una capa proteica (proteína p17). Más en el interior se localiza la cápside o *core*, de estructura icosaédrica, la cual está formada por un nucleoide en forma de cono truncado (proteína p24), que contiene el material genético (ARN) y las enzimas virales transcriptasa inversa (TI), proteasa (PR) e integrasa (IN) (Figura 1) (56, 135).



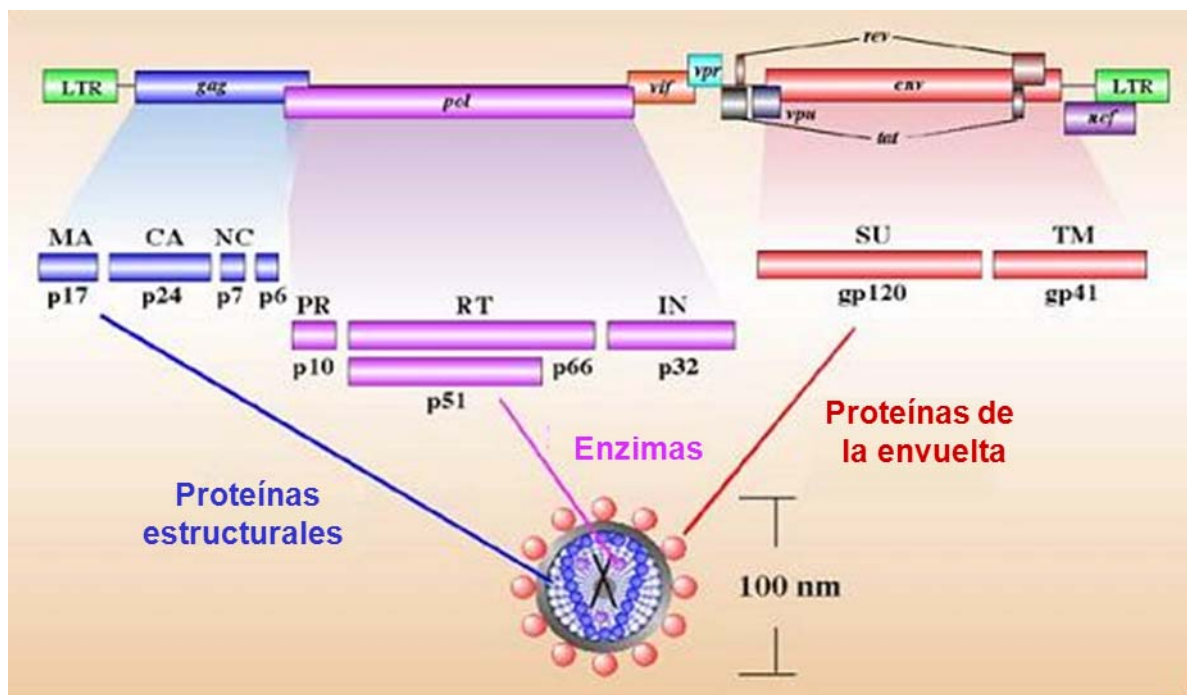
**Figura 1.** Estructura del VIH-1 (7).

### 1.5. ORGANIZACIÓN DEL GENOMA

El genoma viral del VIH-1 es un ARN de cadena sencilla formado por dos hebras idénticas, de polaridad positiva y 9,2 Kb de longitud. Ambas cadenas se mantienen unidas mediante puentes de hidrógeno (60, 135, 183, 306). El esquema de la organización del genoma, con los distintos marcos abiertos de lectura (*open reading frames*, ORF) y las proteínas codificadas por los mismos se presenta en la Figura 2.

El genoma está flanqueado a ambos lados por unas secuencias repetidas largas (*long terminal repeats*, LTR) que permiten su integración en el genoma de la célula huésped. El 5' LTR contiene las secuencias del promotor de la transcripción del virus, al que se unirán factores de transcripción celulares; y el 3' LTR contiene la señal de poliadenilación de los ARN mensajeros (ARNm) virales (60, 135, 158, 306).





**Figura 2.** Organización del genoma del VIH-1.

El genoma de VIH-1 contiene 3 genes estructurales: *gag*, *pol* y *env*. El gen *gag* codifica para las proteínas de la matriz (MA, p17), de la cápside (CA, p24) y de la nucleocápside (NC, p7), además de otros polipéptidos de función menos definida (p1, p2 y p6). El gen *pol* codifica para tres enzimas víricas necesarias para la replicación viral, la proteasa (PR, p10), la transcriptasa inversa (TI, p51/p66) y la integrasa (IN, p32). El gen *env* codifica para la glicoproteína gp160, que es procesada por proteasas celulares para formar las glicoproteínas de la envuelta gp120 (glicoproteína de superficie, SU) y gp41 (glicoproteína transmembrana, TM). Además de estos 3 genes estructurales el genoma viral codifica para 6 genes con función reguladora y accesorio: *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr* y *vpu* (Tabla 1) (135, 158, 171, 183, 306).

El VIH-1, al igual que todos los retrovirus, se caracteriza porque en su ciclo replicativo alternan ADN y ARN como material genético. En su etapa extracelular (como virión circulante), almacena su información genética en forma de ARN lineal, mientras que en su fase intracelular (denominado *provirus*) la información genética se encuentra en forma de ADN bicatenario

integrado en el ADN celular, replicándose como parte del genoma celular (135, 158, 171, 183, 306).

**Tabla 1.** Esquema de las proteínas estructurales, reguladoras y accesorias del VIH-1 (135, 171, 183, 306).

Proteínas Estructurales		
<b>gag</b>	<b>p17</b>	Proteína miristilada de la matriz (MA), anclaje de la membrana, transporte al núcleo.
	<b>p24</b>	Proteína de la cápside (CA).
	<b>p7</b>	Proteína de la nucleocápside (NC), unión a ARN.
	<b>p6</b>	Proteína que favorece la maduración del virus, unión a Vpr.
	<b>p1 y p2</b>	Fragmentos cortos de función desconocida que separan p7 y p6.
<b>pol</b>	<b>p10</b>	Enzima proteasa (PR).
	<b>p51/p66</b>	Son las dos subunidades de la enzima transcriptasa inversa (TI).
	<b>p15</b>	RNasa H, presente en la subunidad p66 pero no en la p51.
	<b>p32</b>	Integrasa (IN).
<b>env</b>	<b>gp120</b>	Glicoproteína de la superficie (SU), unión del receptor.
	<b>gp41</b>	Glicoproteína transmembrana (TM), fusión de la membrana.
Proteínas Reguladoras		
<b>tat</b>	<b>p14</b>	Activador de la transcripción de todos los ARNm virales.
<b>rev</b>	<b>p19</b>	Transporte selectivo del ARNm genómico y los ARNm parcialmente procesados mediante <i>splicing</i> del núcleo al citoplasma.
Proteínas Accesorias		
<b>nef</b>	<b>p27</b>	Regula negativamente la expresión del receptor CD4 y el MHC-I.
<b>vif</b>	<b>p23</b>	Aumenta la infectividad viral. Actúa contrarrestando la acción de la enzima celular APOBEC3G.
<b>vpr</b>	<b>p15</b>	Facilita la entrada del complejo de preintegración al núcleo y detiene el ciclo celular en G2.
<b>vpu</b>	<b>p16</b>	Presente sólo en VIH-1. Aumenta la liberación de viriones de la célula infectada. Interviene en la degradación de CD4 en el retículo endoplásmico. Anula a tetherin.

### 1.5.1. Genes estructurales

El ARN genómico de VIH-1 contiene tres ORF que corresponden a los genes estructurales *gag*, *pol* y *env*, respectivamente, los cuales codifican para las distintas proteínas que formarán los nuevos viriones y que se describen a continuación (135, 158, 171, 183, 306).

#### A) Proteínas estructurales

El gen *gag* se localiza en el segmento 5' del genoma viral y codifica para una poliproteína precursora denominada p55, la cual es procesada por proteólisis enzimática para formar las proteínas estructurales p17, p24, p7, p6, p1 y p2.

- **Proteína de la matriz (MA, p17)**: en el extremo N-terminal de esta proteína se une covalentemente el ácido mirístico y las interacciones hidrofóbicas de este ácido graso permiten la asociación de la matriz (Gag y el precursor de Gag-Pol) con la parte lipídica de la membrana viral, proporcionando mayor rigidez al virión. Además, interacciona con la proteína transmembrana de la envoltura viral (gp41), favoreciendo su anclaje a la membrana. También participa en el transporte del complejo de preintegración al núcleo.
- **Proteína de la cápside (CA, p24)**: es la proteína del núcleo (*core*) del virión, al cual proporciona su forma característica de cono truncado. Esta proteína es importante para el ensamblaje de la nucleocápside y se necesita para la capacidad infecciosa del virión.
- **Proteína de la nucleocápside (NC, p7)**: es una proteína básica que se asocia fuertemente al genoma de ARN, promueve su dimerización y contribuye a condensarlo para encapsidarlo.
- **p6**: corresponde a la parte C-terminal de la proteína Gag. Su función no está totalmente definida. Se une a la proteína accesoria Vpr y favorece la maduración del virus. Mutantes de esta proteína son defectivos en la gemación.

- **p1 y p2**: ambas proteínas son fragmentos cortos de función desconocida que separan p7 y p6.

## **B) Enzimas virales**

El gen *pol* codifica para la poliproteína precursora p90, que es procesada para formar las enzimas virales necesarias para la replicación viral: p10 (proteasa), p51/p66 (transcriptasa inversa), y p32 (integrasa).

- **Proteasa (PR, p10)**: enzima encargada de realizar los cortes proteolíticos del precursor Gag y Gag-Pol durante la maduración del virión.
- **Transcriptasa inversa (TI, p51/66)**: la TI es una enzima multifuncional ADN polimerasa ARN-dependiente que cataliza la síntesis de ADN a partir de un molde de ARN. También tiene actividad endonucleasa H (ARNasa) en la subunidad p66, lo que le permite degradar el ARN del híbrido ARN-ADN durante la síntesis de ADN, y actividad ADN polimerasa ADN-dependiente (158). La principal característica de la TI es que carece de actividad de autocorrección de lectura, por lo que no puede corregir la incorporación de nucleótidos erróneos durante la síntesis de ADN, provocando una alta frecuencia de mutaciones durante la replicación viral. Además tiene la capacidad de dar saltos entre ambas hebras del genoma de ARN permitiendo la recombinación genética.
- **Integrasa (IN, p32)**: enzima que cataliza la transferencia e integración del ADN de doble cadena lineal (bicatenario) del virus en el genoma celular (158). También tiene un papel en el transporte del complejo de preintegración hacia el núcleo.

## **C) Glicoproteínas virales**

El gen *env* codifica para una glicoproteína precursora, gp160, que es procesada por las proteasas celulares para formar las glicoproteínas de la envuelta viral gp120 y gp41, responsables de la unión del virus a su receptor y

correceptor y de la fusión entre las membranas viral y celular respectivamente (275, 522, 525).

- **Glicoproteína de superficie (SU, gp120)**: de naturaleza hidrofílica, se une de forma no covalente a la glicoproteína gp41. La gp120 tiene un dominio específico en forma de bolsillo, que se une con elevada afinidad al dominio D1-D2 de la molécula CD4 (receptor principal de VIH-1) presente en algunas poblaciones de linfocitos T y en macrófagos. Los análisis de secuencia de aminoácidos de la gp120 revelan la existencia de cinco dominios constantes (C1-C5) y cinco variables (V1-V5). La región V3 exhibe una gran variabilidad y contiene un segmento denominado bucle V3 de aproximadamente 30 aminoácidos flanqueado por dos residuos de cisteína unidos por un puente disulfuro. Es la región dominante frente a la que están dirigidos gran parte de los anticuerpos neutralizantes del VIH. También es el determinante principal del tropismo viral, del uso de correceptores y del fenotipo inductor de sincicios (IS) (135, 158, 326).

Se ha demostrado que la presencia de aminoácidos con carga positiva en las posiciones 11 y/o 25 de la región V3 se relaciona con el uso del correceptor CXCR4 y el fenotipo IS, mientras que la presencia de aminoácidos con carga neutra o negativa son predictivos del uso del correceptor CCR5 y el fenotipo no inductor de sincicios (NIS) (326).

- **Glicoproteína transmembrana (TM, gp41)**: en la parte N-terminal contiene un dominio de fusión hidrofóbico que le permite insertarse en la bicapa fosfolipídica celular. Esto provoca la fusión de la membrana del virión con la membrana celular y la posterior entrada del virus a la célula. Además, existe un segundo dominio hidrofóbico en la mitad de la gp41, cuya función es anclar la parte proteica a la membrana de la envoltura viral, derivando de aquí su nombre (87).

### 1.5.2. Genes reguladores y accesorios

#### A) Proteínas reguladoras

Los genes reguladores son esenciales para la transcripción y regulación postranscripcional de la expresión de los ARNs virales. En las primeras etapas de la transcripción de ARNs virales se expresan los que codifican para las proteínas reguladoras Tat y Rev y la accesoria Nef (135, 158, 171, 183, 306).

- **Tat (p14)**: el ARN que codifica para esta proteína contiene dos exones codificantes que se unen mediante *splicing*. Esta proteína es un activador de la transcripción de todos los ARNm virales. Tat se une a una estructura en forma de horquilla presente en el extremo 5' de todos los ARNm virales, denominada TAR (*trans-activating response element*). Esta unión está mediada por una proteína celular, Ciclina T, que permite la fosforilación del extremo C-terminal de la ARN polimerasa II celular, lo cual resulta en una eficiente elongación de la polimerización de los ARN virales (158). Este cofactor celular de Tat sólo está presente en células activadas. En su ausencia se produce una represión de la transcripción del ADN proviral, seguido de un período de latencia en los linfocitos T.
- **Rev (p19)**: es una proteína de localización nuclear. Reconoce una estructura presente en todos los ARNm virales no procesados o parcialmente procesados denominada RRE (*rev responsive element*), localizado en el intrón que separa los exones que codifican para Tat y Rev, en la región codificante de Env (122). Rev se une al RRE por el dominio N-terminal, mientras que el dominio C-terminal contiene una señal de exportación nuclear que se une a proteínas celulares para permitir el transporte del ARN desde el núcleo al citoplasma. Además de su función en el transporte de ARN, Rev facilita el acoplamiento de los ARNm a los ribosomas para la síntesis de las proteínas del virus.

**B) Proteínas accesorias**

Los genes accesorios no son esenciales para la replicación viral *in vitro*, pero tienen funciones importantes en el ciclo biológico del virus. Estos son *nef*, *vif*, *vpr* y *vpu*.

- **Nef (p27)**: regula de forma negativa el receptor CD4, reduciendo su expresión en la membrana de la célula infectada mediante su internalización por endosomas y su posterior degradación (56, 135, 171, 288). Esto previene la reinfección de la célula infectada por los nuevos viriones recién generados, lo cual podría llevar a una muerte prematura de la célula (263, 397). Nef también reconoce las proteínas del complejo principal de histocompatibilidad de clase I (*major histocompatibility class I*, MHC-I) presentes en la superficie celular y las internaliza en el Aparato de Golgi, donde quedan retenidos, impidiendo que la célula infectada sea reconocida por los linfocitos T citotóxicos (CTL), permitiendo al virus escapar del ataque del sistema inmune (56). Además, se ha demostrado *in vitro* que Nef favorece la replicación del VIH-1 en linfocitos primarios, aumentando la infectividad del virión al incrementar la estabilidad de la nucleocápside durante la entrada del virus a la célula, por lo que podría considerarse como un auténtico factor de virulencia (304). También, se ha atribuido a Nef una mayor eficacia de la transcripción inversa (420).

Otra propiedad de Nef es su capacidad para activar linfocitos T CD4<sup>+</sup> mediante la modulación de la señalización celular. La proteína Nef producida por una célula infectada por VIH-1 puede reclutar células T circundantes para que sean infectadas. Este mecanismo de reclutamiento es importante al comienzo de la infección, cuando el número de células T activadas en el tejido linfóide es bajo y es un factor limitante en la expansión del VIH (135, 306).

- **Vif (p23)**: esta proteína se expresa en altos niveles en el citoplasma de las células infectadas. Su función es promover la infectividad del virus. La proteína Vif está presente en los viriones maduros. Se ha demostrado que

Vif es necesario para contrarrestar la enzima APOBEC3G, una desaminasa celular, que convierte las citosinas en uracilos durante la síntesis de la hebra negativa de ADN, lo que resulta en una hipermutación G a A durante la síntesis de la hebra positiva, que es letal para el virus (72, 301), constituyendo un mecanismo de defensa de la célula frente al virus. Si la actividad de Vif es incompleta (por mutaciones o una baja expresión), la APOBEC3G, en lugar de actuar como mecanismo contra el virus, puede promover la evolución de VIH-1 y favorecer el escape frente a presiones selectivas farmacológicas o inmunológicas (170, 230, 248, 405, 513).

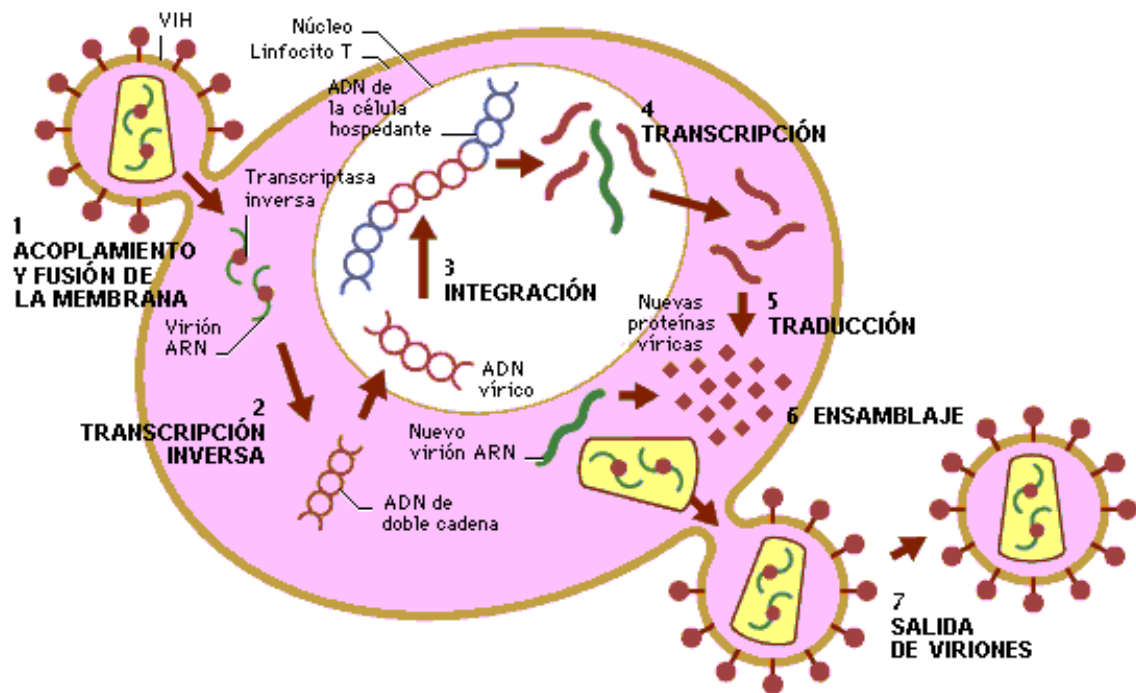
- **Vpr (p15)**: promueve el transporte del complejo de preintegración del VIH-1 al núcleo. Esta acción es particularmente importante en macrófagos, que, debido a su diferenciación terminal y su estado no proliferativo, estaría de otro modo más refractivo a la infección por VIH-1. Además, Vpr produce alteraciones importantes en el ciclo celular deteniéndolo en la fase G2 y activa el promotor transcripcional en el LTR del VIH-1 (135, 171, 183, 306).
- **Vpu (p16)**: además de en VIH-1, esta proteína también está presente en el virus de la inmunodeficiencia de simios de chimpancés y otras tres especies de monos del género *Cercopithecus*, pero no en VIH-2. La proteína Vpu se produce a partir del mismo ARNm que codifica para Env. Es una proteína integral de membrana con una cola intracitoplásmica en el extremo C-terminal. Vpu tiene dos funciones. La primera es permitir la degradación selectiva de las moléculas CD4 cuando éstas se asocian con los precursores de la envoltura viral en el retículo endoplásmico. Esto permite la liberación de la proteína Env del complejo y su subsiguiente incorporación en los nuevos viriones. La segunda función es facilitar la liberación del virión de la membrana citoplásmica. Los mutantes defectivos en *vpu* muestran una acumulación intracelular de las partículas virales (154). Recientemente, se ha descrito que *vpu* es necesaria para contrarrestar el factor de restricción celular *tetherin*, previamente denominado BST-2 o CD317, una proteína transmembrana que inhibe la liberación de los viriones



reteniéndolos en la membrana plasmática de la célula hospedadora (155, 329, 430, 431, 486, 518).

### 1.6. CICLO DE REPLICACIÓN DEL VIH-1

El ciclo de replicación de VIH-1 se divide en distintas etapas: **1)** Fusión y entrada del virus a la célula hospedadora; **2)** Transcripción inversa del material genético; **3)** Integración del provirus en el genoma celular; **4)** Transcripción con generación de ARNm virales; **5)** Traducción y síntesis de proteínas; **6)** Ensamblaje de las nuevas partículas virales; y **7)** Maduración y salida de viriones al medio extracelular (Figura 3) (158, 172, 212, 331, 448, 449, 494).



**Figura 3.** Ciclo de replicación del VIH-1 (8).

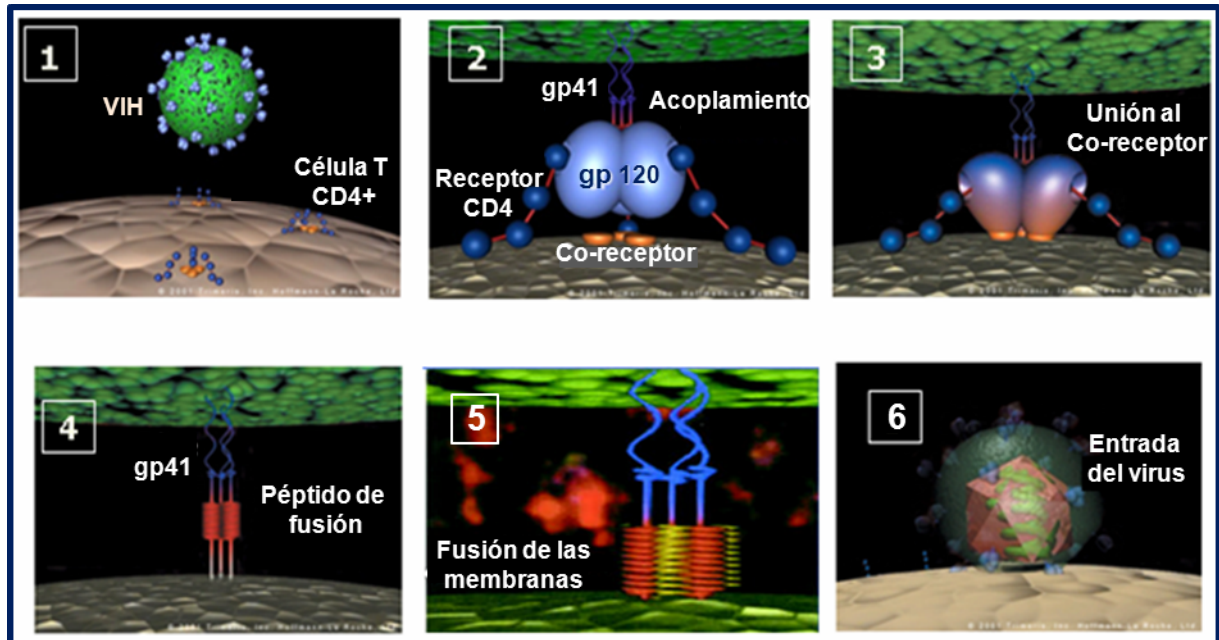
#### 1) Fusión y entrada del virus a la célula hospedadora

La entrada del virus en la célula es un proceso secuencial que se produce mediante la interacción de las glicoproteínas de la envuelta viral y receptores específicos localizados en la membrana celular. Las glicoproteínas de la envuelta forman un complejo trimérico denominado gp160, formado por las dos subunidades gp120 y gp41. La gp120 contiene el sitio de unión al receptor. El

receptor principal es un marcador de superficie denominado CD4, receptor específico y común a todos los subtipos de VIH-1, localizado en los linfocitos T auxiliares y en células de la línea macrófago/monocítica, lo que permite caracterizar el tropismo viral por estos tipos celulares. La gp120 se une con una elevada afinidad al receptor CD4, pero no es suficiente para permitir la entrada del virus a la célula. Esta unión produce un cambio conformacional en la glicoproteína transmembrana gp41, que permite la exposición del péptido de fusión, seguido de la unión a unas moléculas de superficie denominadas correceptores (87, 275, 522, 525). Los dos principales correceptores identificados son CCR5 y CXCR4, ambos miembros de la familia de receptores de las quimioquinas (66). Las quimioquinas son pequeñas moléculas de la familia de las citoquinas que promueven el movimiento celular por quimiotaxis. Sus receptores se caracterizan por tener una estructura con 7 dominios transmembrana compuestos de bucles extra e intracelulares, un dominio N-terminal extracelular y un dominio C-terminal intracelular (267). El CCR5 es el receptor de las  $\beta$ -quimioquinas RANTES, MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$  y el CXCR4 es el receptor de la  $\alpha$ -quimioquina SDF-1. La presencia o ausencia de estos correceptores en determinadas células CD4<sup>+</sup> y la afinidad de la envuelta viral por uno u otro puede explicar el tropismo viral por determinados tipos celulares (326). Todo este proceso culmina en la fusión de la membrana celular y viral, formándose un poro de fusión que permite la entrada del virus a la célula (Figura 4) (158).

En el ciclo de replicación de VIH-1 se ha descrito la participación de otras moléculas de superficie, como las lectinas tipo C denominadas DC-SIGN y L-SIGN, presentes en las células dendríticas y que se unen de forma inespecífica a distintos virus, incluyendo el VIH-1 (31). La función de las lectinas es unir integrinas como ICAM-3 en la membrana de los linfocitos (184). No se consideran receptores específicos, porque la interacción se produce por residuos de carbohidratos y no por cambios conformacionales, por lo que no tienen la especificidad que caracteriza a un receptor. La alta afinidad del VIH-1 por estas moléculas hace que las células dendríticas se encuentren cubiertas de partículas virales en la membrana celular. Esta unión incrementa la infección de los linfocitos CD4<sup>+</sup> circundantes. Este fenómeno, denominado facilitación de

la infección en *trans*, tiene enorme importancia porque promueve la propagación del VIH y hace de los órganos linfoides, y en particular de las células dendríticas, el gran reservorio donde se establece la infección para su posterior transmisión a los linfocitos CD4.



**Figura 4.** Esquema de la fusión y entrada del VIH-1 en la célula hospedadora (27).

## 2) Transcripción inversa del material genético

Tras la entrada del virus en la célula, se produce la internalización de la nucleocápside viral, seguida de la descapsidación y liberación de las hebras de ARN viral en el citoplasma celular. Esta disgregación desencadena el proceso de transcripción inversa para lo que se necesitan tres elementos fundamentales: el ARN genómico viral, un ARNt celular específico (ARNt<sup>Lys3</sup>) y la enzima viral TI.

La TI es una enzima multifuncional ADN polimerasa ARN-dependiente, que utiliza el ARN genómico como molde para catalizar la síntesis de un ADN lineal complementario (ADNc) de cadena sencilla y sentido negativo, que después servirá de molde para sintetizar la hebra positiva de ADN. Además, posee actividad ribonucleasa H (endonucleasa) que le permite degradar el ARN del

híbrido ARN-ADN (158). La enzima carece de actividad exonucleasa 3'-5' que permite corregir la incorporación de nucleótidos erróneos (autocorrección de lectura) durante la síntesis de ADN, lo que trae como consecuencia una alta frecuencia de mutaciones. Otra característica de la TI es su capacidad para saltar de una hebra de ARN a otra durante la síntesis de ADN, lo que unido al carácter dimérico del ARN genómico produce recombinación en elevadas frecuencias (231, 528). Además, si estos saltos ocurren en virus con genomas heterocigotos se producirán genomas recombinantes. En ensayos *in vitro* utilizando líneas celulares epiteliales o linfoides, se ha determinado que la TI del VIH-1 salta aproximadamente  $3 \times 10^{-4}$  nucleótidos o unas tres veces como promedio entre las dos hebras de ARN genómico en cada ciclo replicativo (231, 528), produciéndose dichos saltos generalmente durante la síntesis del ADN de la hebra negativa.

A continuación se describe el proceso de transcripción inversa del material genético que culmina en la síntesis de ADN de doble hebra (Figura 5) (158, 172, 212, 325, 326, 449, 494).

En el genoma viral, la región R representa una secuencia que se repite a ambos extremos del ARN. En el extremo 5' se localiza la región U5 que no es codificante, pero es la primera parte del genoma del virus que sufre la transcripción inversa. En el extremo 3' está la región U3, que no es codificante pero contiene los promotores responsables de la transcripción del provirus. El sitio de unión del cebador (*primer binding site*, PBS), localizado en posición 3' con respecto a la región U5, es complementario a 18 nucleótidos del extremo 3' de un ARNt celular específico (ARNt<sup>Lys3</sup>). Después de la hibridización entre el ARNt<sup>Lys3</sup> y el PBS comienza la transcripción inversa en la región *leader* por parte de la enzima TI, generando una hebra corta de ADN de polaridad negativa denominada “de parada brusca” (*minus strong-stop DNA*), que progresa hasta el extremo 5' del genoma (Figura 5a). Esta hebra de ADN es posteriormente transferida al extremo 3' del ARN genómico, gracias a las secuencias repetidas (R) presentes en ambos extremos del genoma viral y a la capacidad de salto intra e inter-molecular de la TI en el ARN (Figura 5b). Además, si estos saltos ocurren entre hebras diferentes de ARN en virus

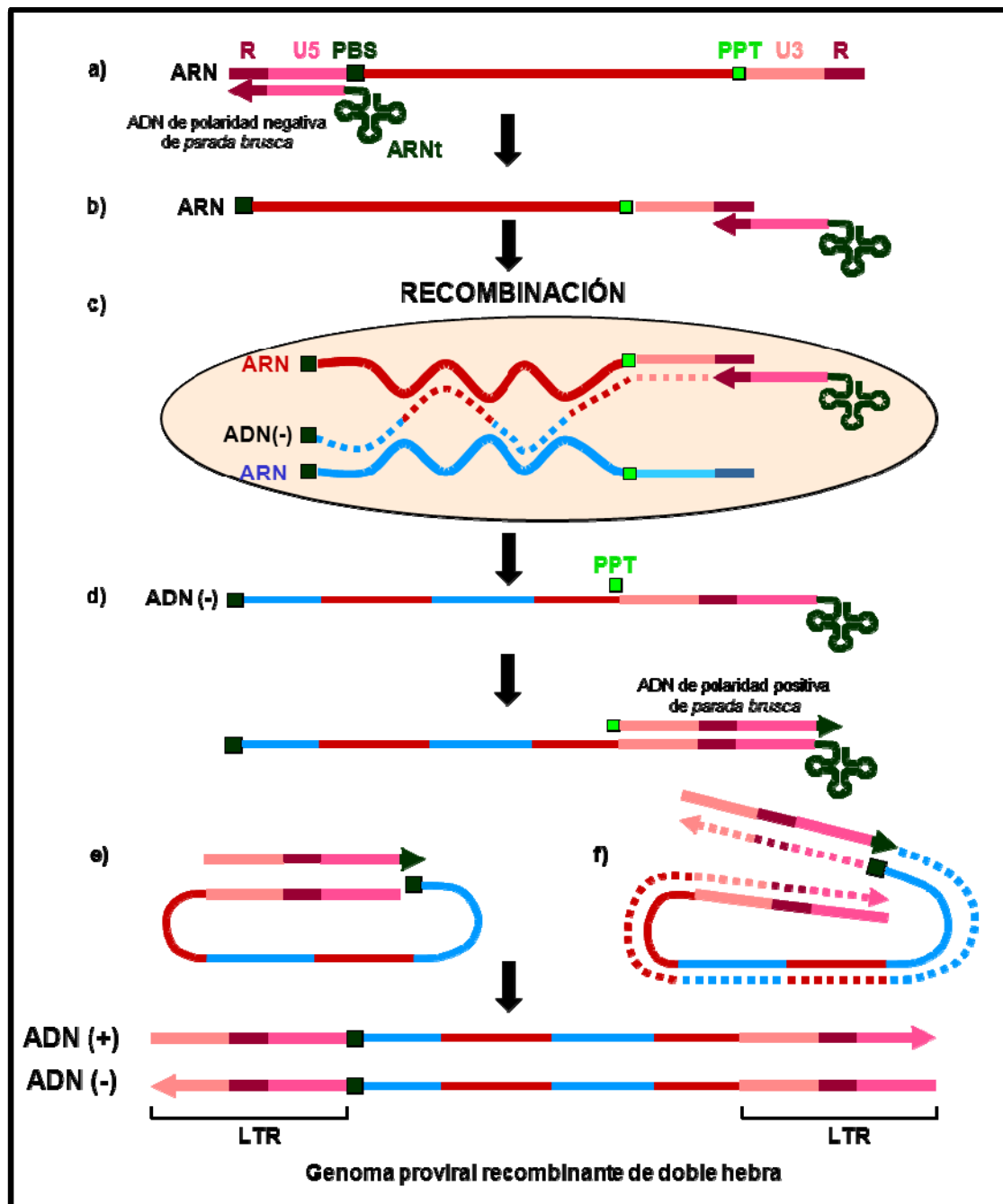
heterocigotos se producirán genomas recombinantes (Figura 5c). La recombinación en retrovirus tiene lugar predominantemente durante la síntesis de la hebra negativa de ADN, en la que se utiliza el ARN como molde. La síntesis de la hebra de ADN complementaria de cadena sencilla y polaridad negativa genera un híbrido ARN/ADN, en el cual, mediante la actividad RNasa H presente en la TI, el ARN es degradado a medida que va polimerizándose el ADN. Un oligonucleótido de ARN rico en bases purínicas (residuos A/G) resistente a la digestión por la RNasa H, denominado tracto polipurínico (*polypurine tract*, PPT), queda en el extremo 5' adyacente al segmento U3 y es utilizado como cebador para iniciar la síntesis de una hebra corta de ADN de polaridad positiva denominada *de parada brusca* (*plus strong-stop DNA*) hasta el extremo 5' de la hebra negativa, copiando 18 nucleótidos del ARNt unido covalentemente, regenerando de esta forma el PBS (Figura 5d). Esta hebra corta de ADN debe realizar un salto de molde a su secuencia complementaria que corresponde al PBS en la hebra de ADN negativa, siendo este salto casi siempre intramolecular (Figura 5e). Ambas hebras se utilizan mutuamente como molde para completar la síntesis del ADN de doble hebra (Figura 5f). En VIH-1 y otros lentivirus también se utiliza un segundo PPT localizado en el centro del genoma (PPT central) como iniciador para la síntesis de ADN de hebra positiva.

Tras completarse la síntesis de ADN de doble hebra a partir del ARN genómico viral, las proteínas virales matriz, integrasa y Vpr se unen al ADN para formar el complejo de preintegración que es transportado desde el citoplasma al interior del núcleo.

### 3) Integración del provirus en el genoma celular

El complejo de preintegración se transporta al interior del núcleo. A continuación, la enzima viral integrasa cataliza la eliminación de dos nucleótidos de cada uno de los LTR presentes en ambas cadenas de ADN, dejando dos extremos 3' OH libres, seguido del ataque nucleofílico de los grupos hidroxilo en ambos extremos y la posterior formación de los enlaces fosfodiéster entre el ADN viral y el ADN cromosómico celular, integrándose el genoma viral en el genoma celular, denominándose a esta forma *provirus*. La

reacción se completa con la ayuda de enzimas y sistemas de reparación celular presentes en la célula infectada. El ADN viral puede integrarse en muchos sitios del genoma celular. Sin embargo, una vez integrado, estas secuencias son incapaces de transponerse dentro de la misma célula.



**Figura 5.** Transcripción inversa del ARN de un retrovirus, con generación de un genoma proviral recombinante (325, 326).

#### 4) Transcripción del ADN proviral y formación de ARNm virales

A partir del estado de provirus, el VIH puede permanecer latente o replicarse de forma controlada o de forma masiva con el consiguiente efecto citopático sobre la célula infectada. Para que los linfocitos CD4<sup>+</sup> infectados expresen ARN viral, se requiere la activación celular mediante estímulos para ser permisiva para la replicación del VIH. La reactivación de la latencia viral necesita de factores de transcripción celulares, como NF-κB, Sp1 y el factor TFIID, que reconocen secuencias específicas presentes en los LTR, a los que se fijan, lo que permite el comienzo de la transcripción del genoma viral en ausencia de proteínas virales.

El factor celular NF-κB es el principal factor de transcripción utilizado por el VIH-1. Pertenece a una familia de proteínas que regulan la transcripción de múltiples genes celulares que participan en los procesos de reconocimiento y activación inmune. No se expresa en los linfocitos CD4<sup>+</sup> que están en reposo celular y es inducido únicamente por los procesos de activación inmune, lo que explica que la replicación del VIH-1 dependa absolutamente de la activación de los linfocitos infectados. De esta manera, el linfocito CD4<sup>+</sup> representa un doble nicho ecológico en el ciclo biológico del VIH-1. En estado de reposo celular permite la latencia viral, al no expresar los factores necesarios para permitir la replicación; y en la activación celular induce el factor de transcripción NF-κB, necesario para iniciar la transcripción del genoma viral, transformándose en una célula permisiva para la replicación viral.

A diferencia de la mayoría de ARNm celulares, los cuales son monocistrónicos, algunos de los ARNm del VIH-1 son policistrónicos. Aunque el genoma viral tiene un solo elemento promotor de la transcripción en los LTR, tiene marcos de lectura abiertos que se solapan parcialmente, para la expresión selectiva y temporal de los diferentes genes virales mediante el *splicing* alternativo, que por corte y empalme permite la regulación de la expresión y la formación de todos los ARNm virales (158, 172). Durante la infección aguda, se han observado tres clases de transcritos primarios: **1)** moléculas de ARN genómico de 9 kb sin procesar, que corresponden a los precursores de las poliproteínas Gag y Gag-Pol, **2)** moléculas de ARN derivados de *splicing* único de ~ 4 kb,

que codifican para las glicoproteínas de Env, las proteínas accesorias Vif, Vpr y Vpu y una forma truncada de Tat, y **3**) moléculas de ARN derivadas de *splicing* múltiple, de ~ 2 kb, que codifican para las proteínas reguladoras Tat y Rev y las accesorias Nef y Vpr (158, 172, 375).

La expresión de las distintas clases de ARN está sujeta a una regulación temporal. Tras la infección aguda, en la fase temprana sólo están presentes en el citoplasma de la célula infectada ARN virales de *splicing* doble. En la fase tardía, por acción de la proteína Rev, son exportados al citoplasma los ARNs de *splicing* único y el ARN genómico no procesado, que codifican para las proteínas estructurales del virus (171, 183).

Las dos hebras de ARN derivan de la transcripción del provirus por parte de la ARN polimerasa II celular (56). Este ARN genómico contiene elementos característicos de los ARNm celulares, como el *cap* (7-metil guanosina) en el extremo 5' y la cola de poliadenina en el extremo 3'. Además, está formado por una serie de estructuras y secuencias características como son la horquilla TAR, a la que se une la proteína Tat; el sitio de unión del ARNt celular específico, que actúa como iniciador de la transcripción inversa; y la señal de encapsidación necesaria para la incorporación del ARN genómico en las nuevas partículas víricas.

El proceso de reactivación de la latencia proviral es rápido y agresivo. En un ensayo basado en transfección de un plásmido que contiene el ADN proviral de VIH-1, se ha determinado que tras la activación linfocitaria, en 2 horas se produce la síntesis de las proteínas virales en la célula, detectándose 4 a 6 horas después viriones maduros en el medio de cultivo (67).

## **5) Traducción y síntesis de proteínas**

Los ARNm virales son transportados al citoplasma, proceso en el cual interviene la proteína Rev facilitando el transporte de los ARNm no procesados o incompletamente procesados mediante *splicing* (pero no de los ARNm de *splicing* doble, cuyo transporte es independiente de Rev). Una vez en el citoplasma, los ARNm virales serán acoplados a la maquinaria de los



ribosomas celulares para iniciar la traducción y síntesis de proteínas. Las proteínas virales recién sintetizadas deben procesarse postraduccionalmente para ensamblarse en las nuevas partículas virales. En este proceso participan la proteína viral Vpu y la enzima viral proteasa (PR). La proteína Vpu no es esencial en la replicación viral, pero en su ausencia se produce una acumulación de proteínas virales en el citoplasma y una menor producción de viriones. La enzima PR cataliza todos los cortes proteolíticos de los precursores de las poliproteínas Gag y Gag-Pol, para dar lugar a proteínas estructurales funcionales, imprescindibles para la maduración del virión (158).

## **6) Ensamblaje de las nuevas partículas virales**

El ensamblaje de las nuevas partículas virales se lleva a cabo por etapas. Primero, se requiere la dimerización del genoma de ARN y el reconocimiento de la señal de encapsidación en el ARN por la maquinaria de ensamblaje viral. Luego, la ribonucleoproteína que contiene el genoma viral de ARN formando el nucleoide, se ensambla con los precursores de las proteínas estructurales Gag y Gag-Pol en el citoplasma. Posteriormente, esta nucleocápside se transporta hacia la membrana celular (179, 383).

## **7) Maduración y salida de viriones al medio extracelular**

Una vez que la nucleocápside está en la membrana celular se produce la miristilación de la proteína p17, la cual une la capa interna de la envoltura viral con la matriz. La salida de los nuevos viriones es favorecida por la proteína Vpu. Por gemación de la membrana plasmática celular, la nucleocápside adquiere la envoltura fosfolipídica y el precursor de Env (gp160), que es cortado por proteasas celulares en las glicoproteínas de superficie gp120 y transmembrana gp41, ambas ancladas en la membrana celular, produciéndose seguidamente la liberación de los viriones, cuya morfología madura por acción de la proteasa viral, que mediante procesamiento proteolítico separa los dominios de las diferentes poliproteínas, incluyendo los precursores de la nucleocápside y de las enzimas virales (69, 179, 482), dando lugar a una nueva progenie de viriones maduros, completos e infecciosos, capaces de iniciar un nuevo ciclo de infección (36).

Se ha estimado que en pacientes infectados crónicamente cada día se generan del orden de  $10^{10}$  viriones, con un tiempo de generación promedio de un virión de 2,5 días (definido como el tiempo que tarda un virus en infectar una célula y producir una nueva generación de partículas virales infecciosas), siendo la semivida de una célula infectada de 1,6 días y de un virión en plasma de 1 hora (346, 377). Esto significa que el VIH-1 se replica con una frecuencia de 140 ciclos por año, con sus consiguientes mutaciones y recombinaciones en cada ciclo de replicación. Además, un número variable de linfocitos no activados (en reposo) son células de memoria que mantendrán el genoma viral latente, siendo un reservorio viral importante con una prolongada vida media.

### 1.7. ETAPAS DE LA INFECCIÓN POR VIH-1

El VIH-1 causa una infección crónica en la que el virus se replica de forma continua en las células del huésped, ocasionando un progresivo deterioro del sistema inmune, particularmente una disminución de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, produciéndose con el tiempo una inmunosupresión severa que culmina con el desarrollo del SIDA (271, 303). El tiempo que cada persona infectada por el virus necesita para desarrollar la enfermedad es variable. Se ha descrito una minoría de individuos infectados (5-10%) que viven con el VIH por más de 10 años sin desarrollar la enfermedad, denominados no progresores a largo plazo (*long-term nonprogressors*), que se caracterizan por mantener un recuento normal de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y baja carga viral en ausencia de tratamiento antirretroviral. En cambio, en otros casos la supresión inmune puede ocurrir rápidamente, progresando a SIDA y causando la muerte en 2 o 3 años después de la infección (306). Estas variaciones reflejan la compleja interacción entre el virus y el sistema inmune del huésped. Adicionalmente, la superinfección y la generación de virus recombinantes pueden acelerar la progresión de la enfermedad y aumentar la transmisión sexual debido al incremento de la carga viral en la sangre y el tracto genital (73, 110).

La infección por VIH-1 se divide en tres etapas: **1)** Primoinfección o infección aguda, **2)** Infección crónica asintomática; e **3)** Infección sintomática o SIDA (Figura 6) (271, 306).

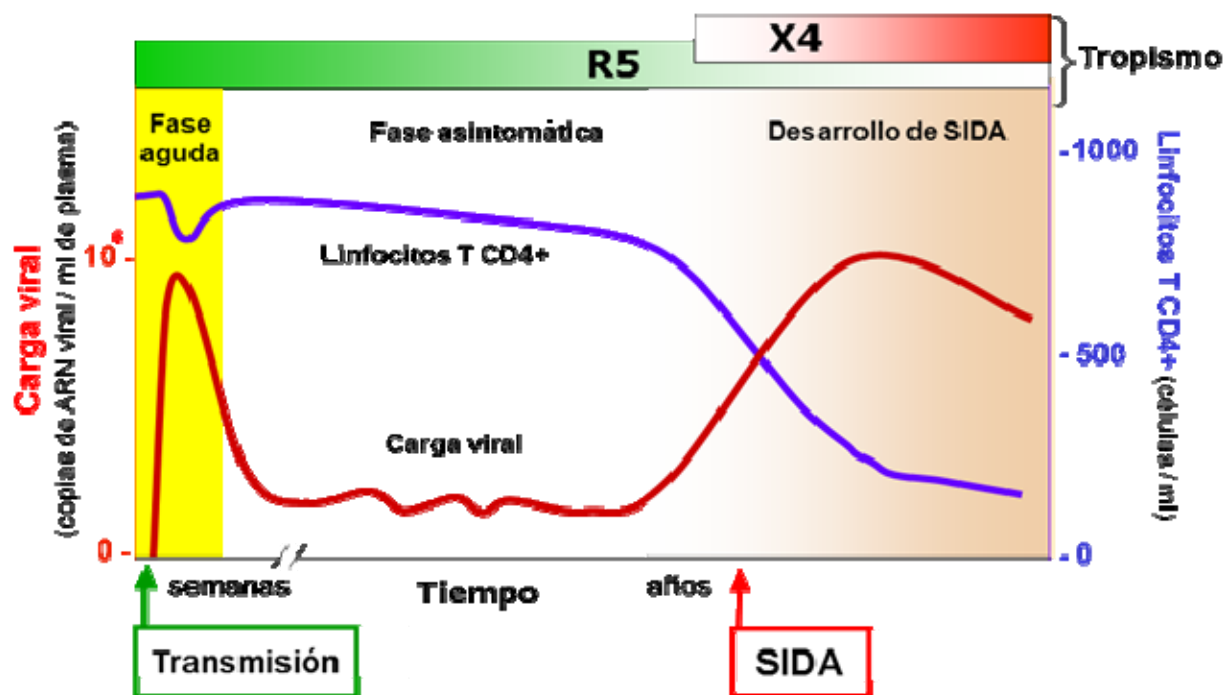


Figura 6. Curso clínico de la infección por VIH-1 (300).

### 1) Primoinfección o infección aguda

En la primoinfección o infección aguda la entrada del virus a través de las mucosas implica su asociación con las células dendríticas, las cuales transportan el virus hacia los tejidos linfoides. El virus puede rápidamente replicarse en los linfocitos activados y macrófagos. Biológicamente, esta fase se caracteriza por un pico de antígenos virales, altos niveles de viremia ( $\geq 10^6$  copias de ARN viral/ml de plasma) y un pico de interferones  $\alpha$  y  $\gamma$ . La primera respuesta inmune desarrollada frente a la infección es mediada por linfocitos T citotóxicos (CTLs), que reconocen y lisan las células que presenten vía MHC-I péptidos virales en la superficie celular. Su aparición coincide con una disminución en la replicación viral, que se ve reflejada en una reducción en los niveles de carga viral en plasma. La respuesta inmune humoral mediada por anticuerpos neutralizantes, dirigidos contra las glicoproteínas de la envuelta, es más tardía detectándose 3 a 4 meses tras la transmisión, aunque previamente (3 a 4 semanas) se detectan anticuerpos no neutralizantes dirigidos contra las glicoproteínas virales y proteínas internas (300, 306). Sin embargo, la respuesta inmune es incapaz de anular la replicación del VIH-1 y el virus

continúa replicándose a lo largo de todo el curso de la infección, detectándose tanto en plasma como en ganglios linfáticos, lo cual permite la generación continua de mutantes de escape que eluden la presión inmune ejercida por los CTLs y los anticuerpos neutralizantes (respuesta inmune celular y humoral).

La infección aguda dura entre dos a seis semanas. Cuando los niveles de replicación viral son altos, clínicamente los síntomas que se pueden detectar son fiebre, linfadenopatía, cefalea y síntomas inespecíficos parecidos a los de otras infecciones virales agudas. Sin embargo, en ocasiones la infección puede ser completamente asintomática (306).

En la mayoría de los casos la infección se establece a partir de un único virus (34, 245), lo que determina que durante la infección aguda las poblaciones virales sean altamente homogéneas. Sin embargo tras el desarrollo de la respuesta inmune, durante el período de inmunocompetencia, la diversidad viral se va incrementando progresivamente (422). En esta primera etapa de la infección predominan los aislados virales con tropismo a CCR5, NIS y macrófago-trópicos (418, 462, 493).

La presencia de macrófagos y células de Langerhans en las mucosas que recubren las vías de transmisión sexual pueden contribuir a la selección de cepas R5 (521). Además, estos tipos celulares producen SDF-1 $\alpha$  (ligando de CXCR4), por lo que se ha sugerido que la presencia de esta quimioquina en el sitio de transmisión contribuye a la internalización de CXCR4 y la consiguiente selección de las cepas CCR5-trópicas (183).

## **2) Infección crónica asintomática**

Esta fase de latencia clínica, sin síntomas, generalmente tiene una duración de entre cinco a diez años y se caracteriza por una replicación viral continua. Sin embargo, se mantiene una fuerte respuesta inmune con niveles de linfocitos CD4<sup>+</sup> relativamente estables, pero con tendencia a descender progresivamente, estableciéndose un estado de equilibrio entre la producción y eliminación del virus.

Los linfocitos CD8<sup>+</sup> permanecen ligeramente aumentados durante el período asintomático, lo que indica actividad citotóxica contra el virus, que no es capaz de suprimir completamente la replicación viral. En esta etapa asintomática aparecen los anticuerpos neutralizantes contra el VIH-1. En algunos casos la viremia desciende e incluso puede llegar a ser indetectable. Sin embargo, el virus continúa su replicación en el tejido linfoide (ganglios linfáticos periféricos, tejido linfoide intestinal, bazo) pese a la presencia de CTLs y anticuerpos neutralizantes. Debido a la continua presión inmune las poblaciones víricas se hacen cada vez más heterogéneas.

Con el tiempo el número de linfocitos CD4<sup>+</sup> decae persistentemente, aunque los niveles de ARN viral en plasma permanecen relativamente estables. El nivel basal de replicación viral, que es distinto para cada individuo, determinará el tiempo que durará el periodo asintomático, estableciendo un importante marcador virológico de progresión de la enfermedad. A menor nivel de viremia alcanzado, mayor será la duración de la fase asintomática.

### **3) Infección sintomática o SIDA**

En la etapa avanzada, los recuentos de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> son inferiores a 200 células/ $\mu$ l y se produce una destrucción de la arquitectura celular de los ganglios linfáticos. Esta degeneración del tejido linfoide puede deberse tanto a la replicación directa del virus como a la estimulación inmune crónica. Comienzan a desarrollarse un conjunto de síndromes característicos del SIDA, como infecciones oportunistas, algunas neoplasias, alteraciones neurológicas y otros síntomas propios de la enfermedad, que en conjunto causan una profunda alteración del estado general del paciente. Además, en esta fase sintomática los linfocitos CD4<sup>+</sup> y CTLs disminuyen, la cinética de replicación viral se hace más rápida y la infección se propaga hacia un número más diverso de tipos celulares. Sin embargo, se observa una disminución en la diversidad genética, haciéndose las poblaciones virales más homogéneas por la falta de presión del sistema inmune. En esta etapa, en más del 50% de los individuos infectados se aíslan virus que utilizan CXCR4 o que tienen tropismo doble hacia CCR5 y CXCR4. Este cambio de correceptor está asociado a un

rápido descenso de las células T CD4<sup>+</sup> y una aceleración en la progresión de la enfermedad (254, 418, 462).

El patrón de evolución genética de VIH-1 a lo largo de la infección indica que, en ausencia de tratamiento antirretroviral, el sistema inmune del hospedador es la fuerza selectiva más importante en la evolución viral.

### **1.8. VARIABILIDAD GENÉTICA DEL VIH-1**

Una característica importante de todos los lentivirus, y en particular del VIH-1, es su extraordinaria diversidad genética la cual deriva de **1)** el gran número de errores introducidos por la enzima viral TI durante la polimerización del ADN proviral, **2)** los frecuentes eventos de recombinación durante la transcripción inversa, **3)** los tiempos cortos de replicación (alto *turnover* viral); y **4)** el gran tamaño de las poblaciones virales (247, 325, 375, 468).

La variabilidad genética del VIH-1 puede influir directamente en la capacidad patogénica y en la selección de cepas virales con mayor actividad replicativa, mejor capacidad para evadir el sistema inmune o la presión selectiva de fármacos, así como en el tropismo celular y las características biológicas del virus (73, 247, 375, 509).

#### **1.8.1. Mutaciones**

La enzima viral TI durante la polimerización del ADN proviral a partir del ARN genómico introduce un gran número de mutaciones debido a la incorporación de nucleótidos erróneos, las cuales no pueden ser corregidas porque la TI carece de actividad de autocorrección de lectura (exonucleasa 3'-5') presente en las enzimas ADN polimerasas celulares. En ensayos *in vitro*, se ha determinado que la tasa de mutación de la TI del VIH-1 está entre 1,4 y 5,4 x 10<sup>-5</sup>/base/ciclo replicativo (35, 181, 224, 286, 287), lo cual corresponde aproximadamente a 0,3 - 1 mutaciones por genoma viral por ciclo replicativo. Las mutaciones introducidas por la TI en el genoma viral pueden ser sustituciones de nucleótidos (90-92%) o inserciones/deleciones (8-10%). Las sustituciones de nucleótidos son el tipo de mutación más común y pueden ser de dos tipos: transiciones (Ts), una mutación entre dos purinas (A↔G) o dos

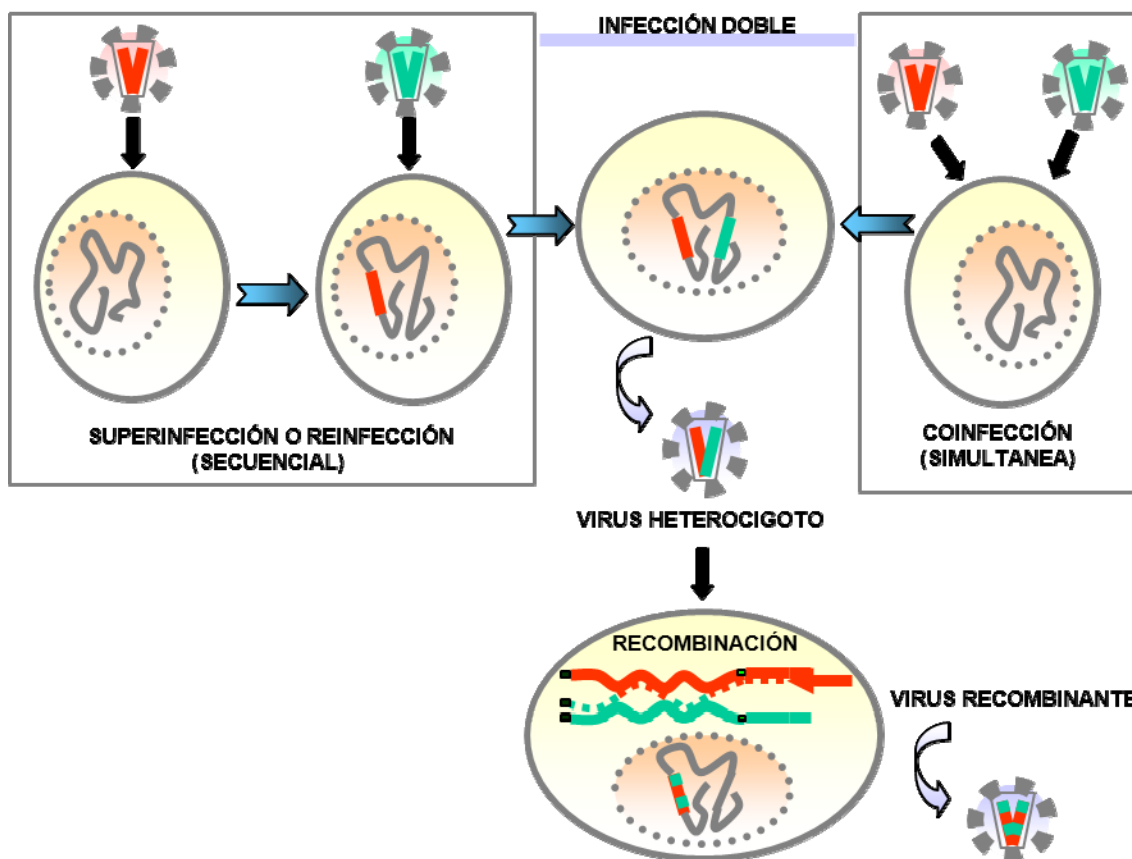
pirimidinas ( $T \leftrightarrow C$ ), y transversiones ( $Tv$ ), una mutación entre una purina y una pirimidina ( $A \leftrightarrow C$ ,  $A \leftrightarrow T$ ,  $G \leftrightarrow C$ ,  $G \leftrightarrow T$ ).

### 1.8.2. Recombinación genética

El mecanismo de recombinación genética en el VIH-1 es una característica inherente al virus debido a la naturaleza de su genoma, dos hebras homólogas de ARN (diploide) y porque durante la replicación la enzima viral TI da saltos inter-moleculares a lo largo del genoma (528). La frecuencia de recombinación de VIH-1 no es homogénea a lo largo del genoma viral (47, 168, 282), sino que se han descrito algunos segmentos específicos en el genoma viral donde ocurre con mayor frecuencia los saltos de la TI denominados “puntos calientes de recombinación” (*recombination hot spots*) (528). En cultivo *in vitro* se han identificado varios de estos sitios: 1) la región próxima al codón de iniciación de Gag (156), 2) el segmento 5' de Pol, 3) el dominio C2 de Env relacionado con una estructura en horquilla que induce el cambio de molde (175); y 4) los segmentos próximos a trectos homopoliméricos (156, 209).

Para que se genere un retrovirus recombinante, se requiere que una misma célula sea infectada por dos viriones genéticamente distintos (Figura 7), bien simultáneamente (coinfeción) o secuencialmente (reinfección o superinfección) (73, 140, 325, 375). Los ADNs provirales derivados de ambos viriones pueden integrarse en el ADN cromosómico, lo que permite que la célula doblemente infectada genere viriones heterocigotos, en los que cada una de las dos hebras de ARN genómico encapsidadas en los mismos procede de un virión diferente. En un segundo ciclo de replicación, se puede generar un genoma recombinante mediante saltos alternativos de la TI viral entre las dos hebras coencapsidadas (325, 326).

En el VIH-1 la recombinación puede ocurrir entre virus distintos del mismo subtipo (recombinación intrasubtipo), de diferentes subtipos (recombinación intersubtipo), o de diferentes grupos (recombinación intergrupo) (73, 326, 432).



**Figura 7.** Generación de un retrovirus recombinante a partir de una infección doble (325, 326).

En estudios iniciales se calculó que por cada ciclo de replicación del VIH-1 se produce una media de dos a tres saltos de la TI entre una y otra hebra de ARN (464, 528), aunque en estudios posteriores otros autores describieron que el VIH-1 recombina *in vitro* un promedio de nueve veces en cultivo de linfocitos T y treinta veces en cultivo de macrófagos por genoma por ciclo de replicación (270).

*In vivo* se ha encontrado que el 75-80% de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> en el bazo de pacientes infectados por VIH-1 está infectado por dos o más provirus, favoreciendo las condiciones necesarias para la generación de virus recombinantes (237). La frecuencia de recombinación del VIH-1 *in vivo* estimada por diversos autores es menor de la descrita en ensayos *in vitro*,



situándose entre  $1,4 \times 10^{-4}$  y  $1,4 \times 10^{-5}$  eventos de recombinación/sitio/generación (328, 417).

La recombinación en el VIH-1 es un mecanismo fundamental en la estrategia de replicación, ya que permite la reparación de genomas dañados o defectivos (133), aumenta la diversidad genética de las poblaciones virales e incrementa el ritmo de evolución viral (73, 314, 422), acelerando la propagación de mutaciones de escape frente a presiones inmunes (314, 443), de resistencia frente a fármacos antirretrovirales (119, 315, 333), o compensatorias de otras perjudiciales para la replicación viral. Además, permite la producción de virus más virulentos y con tropismo celular alterado (73).

En los últimos años el reconocimiento de la importancia de la recombinación como mecanismo generador de diversidad genética y de evolución del virus ha aumentado considerablemente. El análisis filogenético de distintos segmentos del genoma viral, incluyendo la proteasa y la transcriptasa inversa utilizadas para la detección de mutaciones de resistencia, la envuelta para el análisis de variabilidad y evolución, y, particularmente, el análisis de los genomas completos de VIH-1, han permitido entender el complejo panorama epidemiológico de la infección a nivel mundial. Todos estos estudios indican que las formas recombinantes del VIH-1 son más prevalentes y están mucho más extendidas geográficamente de lo que se pensaba.

### **1.8.3. Dinámica poblacional**

El VIH-1, al igual que todos los virus de ARN durante la replicación viral genera una mezcla de variantes debido a la incorporación de nucleótidos erróneos por la TI. Al conjunto de todas las variantes virales que coexisten en un individuo en un momento determinado se denomina *cuasiespecie* (145-147, 293). Todas estas variantes genéticas están relacionadas entre sí, pero presentan características genotípicas y fenotípicas propias, y constituyen una unidad evolutiva. Algunas serán letales, pero entre las que sobreviven se produce una gran heterogeneidad. Sin embargo, la población más homogénea y frecuente constituye lo que se denomina *cepa master*, que es la secuencia promedio o consenso de la población y la que predomina en la cuasiespecie (145-147).

Esta distribución no es arbitraria, sino que se basa en las secuencias virales con mayor eficacia o capacidad replicativa (*fitness* biológico), imprescindible para la adaptación y el éxito evolutivo (109, 145, 147, 371, 422). Este mecanismo de selección viral está directamente relacionado con la capacidad del virus de replicarse, de transmitirse a un nuevo hospedador y de causar enfermedad (virulencia o patogenicidad) (371, 477). Sin embargo, la presencia de factores virales o del hospedador, como la respuesta inmune o la presión selectiva de fármacos, pueden afectar la selección y predominio de variantes virales que en condiciones normales son minoritarias (109, 346, 509).

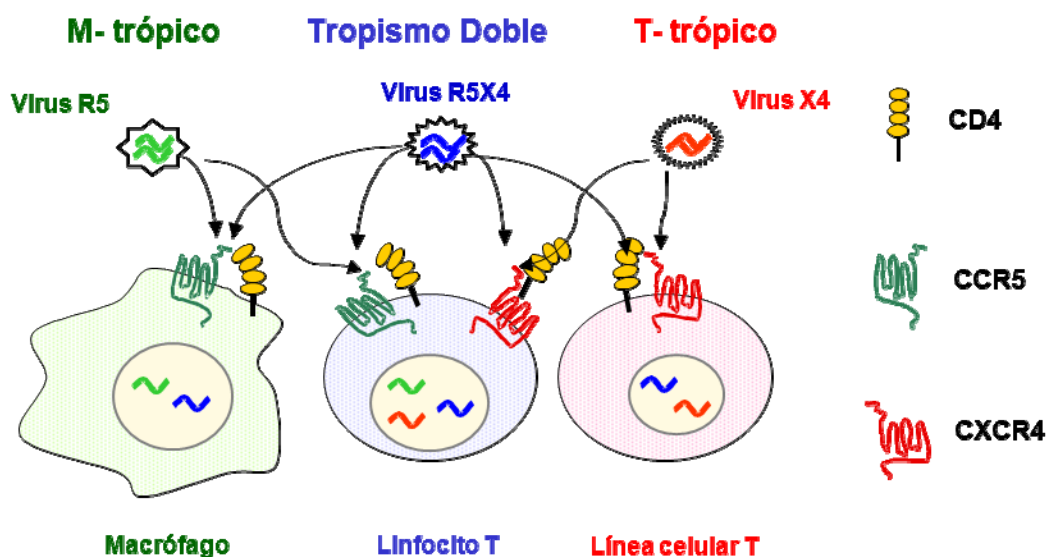
En ausencia de tratamiento antirretroviral el sistema inmune del hospedador es el principal mecanismo de presión selectiva del virus, ejercida por los CTLs y por anticuerpos neutralizantes, lo que resulta en una expansión de variantes virales con mutaciones de escape necesarias para evadir el ataque del sistema inmune (422, 509).

La estructura en cuasiespecie confiere al virus la capacidad de responder rápidamente a las diferentes fuerzas selectivas, tanto inmunológicas como farmacológicas, mediante la selección de las variantes que poseen la capacidad de eludir tales presiones del entorno (145, 146, 293). En algunos casos estas variantes están presentes en la cuasiespecie antes de enfrentarse a la presión selectiva, como lo demuestra la presencia de mutaciones asociadas a resistencia en pacientes que no han recibido terapia antirretroviral, constituyendo las denominadas resistencias naturales (136, 322, 323, 351).

Otro factor importante que ejerce presión selectiva en la población viral es el uso de correceptores para la entrada del virus a la célula, afectando las propiedades biológicas y patogenicidad del virus (Figura 8). Durante las primeras etapas de la infección las poblaciones virales son en general altamente homogéneas. Los virus que se aíslan utilizan el correceptor CCR5 (virus R5), tienen un fenotipo NIS y se replican en macrófagos y linfocitos T primarios activados (M-trópicos) (50, 120, 126, 418, 493). Con el tiempo, las poblaciones virales se van diversificando mediante los mecanismos de mutación, recombinación y selección. Como el VIH-1 causa infección crónica

en los individuos infectados, ocurren largos períodos de replicación que favorecen la diversidad genética, y en las etapas avanzadas de la infección frecuentemente hay un cambio en el uso de correceptores (50, 120, 418, 509). En estas etapas, en aproximadamente el 50% de los individuos, los virus que se aíslan utilizan el correceptor CXCR4 (virus X4) o tienen un tropismo doble (virus R5X4), lo cual se asocia a un fenotipo inductor de sincicios (IS) y a la capacidad para replicar en líneas celulares T tumorales que expresan CXCR4 (T-trópicos) (73, 183, 306).

La heterogeneidad espacial o compartimentación es otro factor importante a considerar en la variabilidad genética del VIH-1, definida como la presencia de distintas variantes virales en distintos órganos de un individuo. Se ha demostrado la existencia de una compartimentación del virus a nivel celular y a nivel de diferentes órganos como el sistema nervioso central, el tracto genital o el riñón (336), así como dentro un mismo sistema orgánico. La compartimentación anatómica del VIH-1 se refleja en la generación de poblaciones virales filogenéticamente diferenciables entre los distintos órganos (446, 527).



**Figura 8.** Clasificación del VIH-1 según el tropismo celular (348).

Las poblaciones virales están en constante evolución, como consecuencia de la replicación y la selección. Sin embargo existen poblaciones virales que no evolucionan, formadas por virus que persisten de forma latente integrados en el genoma de linfocitos CD4<sup>+</sup> de memoria en reposo o en macrófagos (426), constituyendo otro factor en la generación de diversidad genética del VIH-1 *in vivo*. Estas poblaciones constituyen un reservorio o archivo permanente de las distintas variantes virales que han replicado a lo largo de la infección, incluyendo a las variantes resistentes a fármacos antirretrovirales que surgen durante el tratamiento (82, 426, 439), y que mantienen la capacidad de reemerger muchos años después de su generación, impidiendo la erradicación del virus incluso con las combinaciones más potentes de fármacos antirretrovirales (426, 439).

### 1.9. CLASIFICACIÓN FILOGENÉTICA DEL VIH

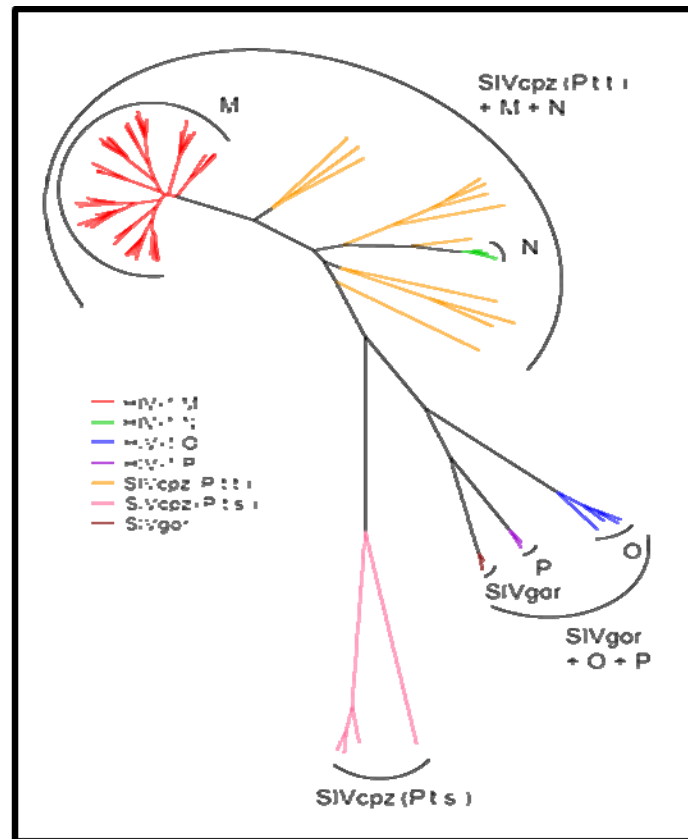
El VIH-1, gracias a sus altos ritmos de mutación y recombinación y a través de introducciones puntuales y eventos fundadores en diversas poblaciones, se ha diversificado extensamente en múltiples formas genéticas, distinguibles mediante análisis filogenéticos de secuencias, denominadas grupos, subtipos, subsubtipos y formas recombinantes circulantes y únicas. El VIH-1 ha sido clasificado en 4 grupos filogenéticos distintos, denominados M (de *main* o *principal*), O (de *outlier* o externo), N (de *non-M*, *non-O*) y P, de los cuales el grupo M es el causante de la pandemia. El grupo O solamente circula en África central occidental, principalmente en Camerún y países circundantes. Sin embargo en Camerún, donde tiene mayor prevalencia, sólo representa 1% de las infecciones por VIH-1 (500, 517). El grupo O se diferencia del M en aproximadamente 50% de la secuencia de nucleótidos del gen de la envuelta (306). El grupo N se ha detectado en un número muy reducido de personas, todas ellas en Camerún, donde representa menos del 0,1% de las infecciones (53, 484). El grupo P, recientemente identificado, se ha detectado únicamente en dos individuos en Camerún (362, 485). Los 4 grupos de VIH-1 derivan de 4 introducciones independientes a partir de simios antropoides africanos, lo cual se infiere de la topología de los árboles filogenéticos en los que se incluyen virus de inmunodeficiencia del simio de chimpancés (SIVcpz) y de gorilas (SIVgor), en los que los 4 grupos de VIH-1 ramifican independientemente entre

sí, los grupos M y N junto con aislados de SIVcpz, y los grupos O y P junto con aislados del SIVgor (Figura 9). El origen de los grupos M y N a partir de SIVcpz (*Pan troglodytes*), y más concretamente, de los virus que infectan la subespecie *Pan troglodytes troglodytes* (P.t.t.), que habita en África central occidental, se infiere claramente de la topología de los árboles filogenéticos (Figura 9), ya que dichos grupos de VIH-1 ramifican intercalados entre aislados de SIVcpz de dicha subespecie (180), habiéndose hallado linajes de SIVcpz muy próximos a los grupos M y N en chimpancés que habitan el sur de Camerún (114, 246). Los grupos O y P, por el contrario, ramifican por fuera del clado del SIVgor, que está filogenéticamente relacionado con el SIVcpz de la subespecie P.t.t., por lo que existen dudas sobre si los grupos O y P derivan de transmisiones a partir de gorilas o si tanto dichos grupos del VIH-1 como el SIVgor derivan por separado de variantes del SIVcpz que aún no se han identificado (453).

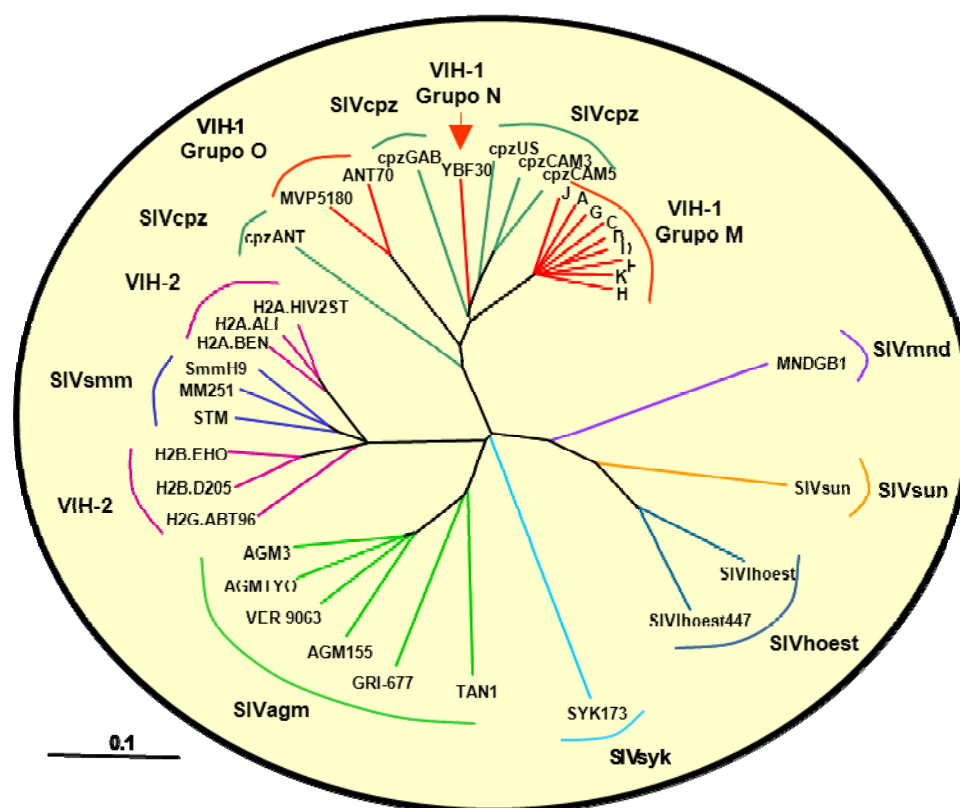
Se ha postulado que el SIVcpz tiene un origen recombinante entre el SIV que infecta a los monos o mangabeis de caperuza roja SIVrcm (*Cercocebus torquatus torquatus*) y el SIV que infecta al cercopiteco de nariz blanca SIVgsn (*Cercopithecus nictitans*). Esta hipótesis se basa en las topologías discordantes que se observan en los árboles filogenéticos de diferentes regiones del genoma. En *pol*, el SIVcpz está filogenéticamente más cercano al SIVrcm mientras en *env* lo está al SIVgsn (55). La infección en el chimpancé con diferentes SIVs y la posterior recombinación entre los mismos podría haber ocurrido a través del contacto con sangre contaminada de animales, debido a que los chimpancés son de forma natural depredadores de monos más pequeños (453).

El VIH-2 está filogenéticamente relacionado con el virus de la inmunodeficiencia del simio de los mangabeis de cara tiznada (*Cercocebus atys*), denominado SIVsm (denominación derivada del nombre de la especie en inglés, *sootey mangabey*) (Figura 10) (180, 201). El origen del VIH-2 en esta especie también está apoyado por la coincidencia geográfica del área donde el VIH-2 es más prevalente, el África occidental, por la alta prevalencia de infección por SIVsm en dicha especie y por la alta diversidad genética entre los

distintos aislados de SIVsm, lo cual implica su presencia por largo tiempo en los mangabeis de cara tiznada (201). En comparación con el VIH-1, el VIH-2 es menos prevalente y virulento, su carga viral es baja en individuos infectados crónicamente, y tienen relativamente escasa capacidad de transmisión por contacto sexual (306). Los individuos infectados se encuentran principalmente en África occidental, y, de forma más limitada, en India, Portugal, Angola y Mozambique (110). El VIH-2 se subdivide en 8 grupos filogenéticos (antiguamente denominados subtipos), de los cuales el subtipo A y B son los únicos que se han propagado epidémicamente (110, 295).



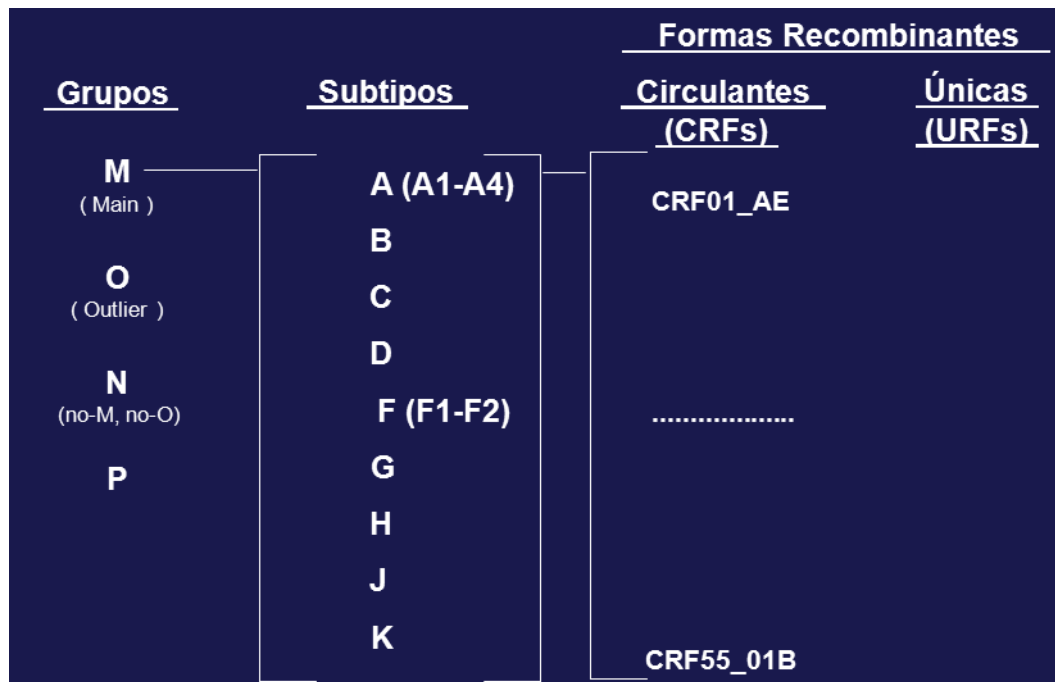
**Figura 9.** Árbol filogenético de máxima verosimilitud de genomas completos de virus de los grupos M, N, O y P de VIH-1, de SIVcpz de las subespecies *Pan troglodytes troglodytes* (P.t.t.) y *Pan troglodytes schweinfurthii* (P.t.s.) y de SIVgor. Se observa la ramificación de los grupos M y N de VIH-1 intercalados entre virus de SIVcpz de P.t.t. y de los grupos O y P junto con virus de SIVgor, en este caso por fuera del clado de los virus de gorilas.



**Figura 10.** Árbol filogenético de secuencias completas de VIH-1, VIH-2 y distintos SIVs africanos. Se observa que VIH-1 está filogenéticamente más cercano a SIVcpz, mientras el VIH-2 está más relacionado con el SIVsm (325).

El análisis filogenético basado en secuencias completas del genoma viral de VIH-1 ha permitido subdividir el grupo M en 9 subtipos distintos, designados A, B, C, D, F, G, H, J y K, 6 subsubtipos y múltiples formas recombinantes circulantes y únicas (Figura 11) (247, 464). Inicialmente, basándose en secuencias parciales de la envoltura, se identificaron los subtipos E e I, pero posteriormente, mediante análisis de genomas completos, se demostró que dichas variantes eran en realidad formas recombinantes intersubtipo que contenían segmentos de subtipos conocidos más otros que no agrupan con ninguno de los subtipos caracterizados en genoma completo, los cuales corresponden a los segmentos asignados a los subtipos E e I. En árboles filogenéticos los subtipos están aproximadamente equidistantes entre sí, con

distancias en la envoltura del 25 al 35% (73, 468), correspondiendo a la región más variable dentro del genoma de VIH-1. Las regiones más conservadas corresponden a los genes *gag* y *pol*, con una divergencia de aproximadamente 15% entre los subtipos, debido a que codifican por enzimas y proteínas estructurales fundamentales para el ciclo biológico del virus (306).



**Figura 11.** Clasificación filogenética de VIH-1 en grupos, subtipos y formas recombinantes.

En los subtipos A y F se han identificado grupos de aislados virales que están filogenéticamente relacionados entre sí, los cuales se denominan subsubtipos. La distancia genética entre subsubtipos es menor que entre los distintos subtipos de VIH-1 (458). El subtipo A se subdivide en cuatro (A1 a A4) (302), aunque el estatus de A3 como subsubtipo es discutido (471), de los que A1 es el predominante y A2 y A4 son muy minoritarios. El F se subdivide en dos, F1 y F2, de los que el F2 está mayoritariamente confinado en Camerún. Los subtipos B y D están filogenéticamente relacionados entre sí y podrían considerarse subsubtipos de un único subtipo, pero por razones históricas se mantiene su designación inicial (465). Los subtipos H, J y K son formas



minoritarias halladas solo en muestras de África central o epidemiológicamente relacionadas con dichas áreas. Todos los subtipos del grupo M de VIH-1, excepto el B, se han originado en África central, y derivan de introducciones puntuales de variantes centroafricanas, probablemente procedentes de la RDC, donde se han documentado los casos más antiguos de infección en dos muestras obtenidas en 1959 (526) y 1960 (514) y donde se ha hallado la mayor diversidad del grupo M (501, 514). El subtipo B deriva de una variante relacionada con el subtipo D procedente de África que, de acuerdo con los análisis filogenéticos de Gilbert *et al.* (186) inicialmente se propagó en Haití, y desde allí, por una parte, a Trinidad y Tobago y, por otra, mediante una única introducción, a los Estados Unidos, desde donde continuó su expansión hacia Europa occidental, otros países de América y otros continentes. Los virus derivados de esta última introducción y subsiguiente diseminación global forman el llamado subclado pandémico, cuyo ancestro común más reciente se dató en torno a 1969 y comprende la casi totalidad de las infecciones por subtipo B fuera del Caribe (186). Mediante análisis de reloj molecular, en el que se utilizaron muestras contemporáneas y las muestras más antiguas recogidas en la RDC (ZR59 y DRC60), se ha estimado el origen del grupo M en 1908, con un intervalo de confianza del 95% entre 1884 y 1924 (514), demostrando que la diversificación del grupo M de VIH-1 en África central occidental ocurrió bastantes décadas antes del reconocimiento de la pandemia del SIDA.

Algunos subtipos poseen variantes o cepas localizadas en determinadas zonas geográficas que tienen un origen filogenético común, pero sus distancias genéticas con el resto de los virus del mismo subtipo no es suficiente para clasificarlos como subsubtipos (458). Ejemplo de esto son los virus de subtipo C que circulan en India y Etiopía, los de subtipo G que circulan en España y Portugal (134, 165, 467), los de subtipo B en el sudeste de Asia y China, y los de subsubtipo A1 en los países de la Antigua Unión Soviética.

### 1.9.1. Formas recombinantes

En áreas geográficas donde circulan varios subtipos del VIH-1 pueden producirse infecciones dobles causadas por virus de distinto subtipo, generándose en algunos casos formas recombinantes, en los que diferentes regiones del genoma proceden de más de un subtipo (325, 375).

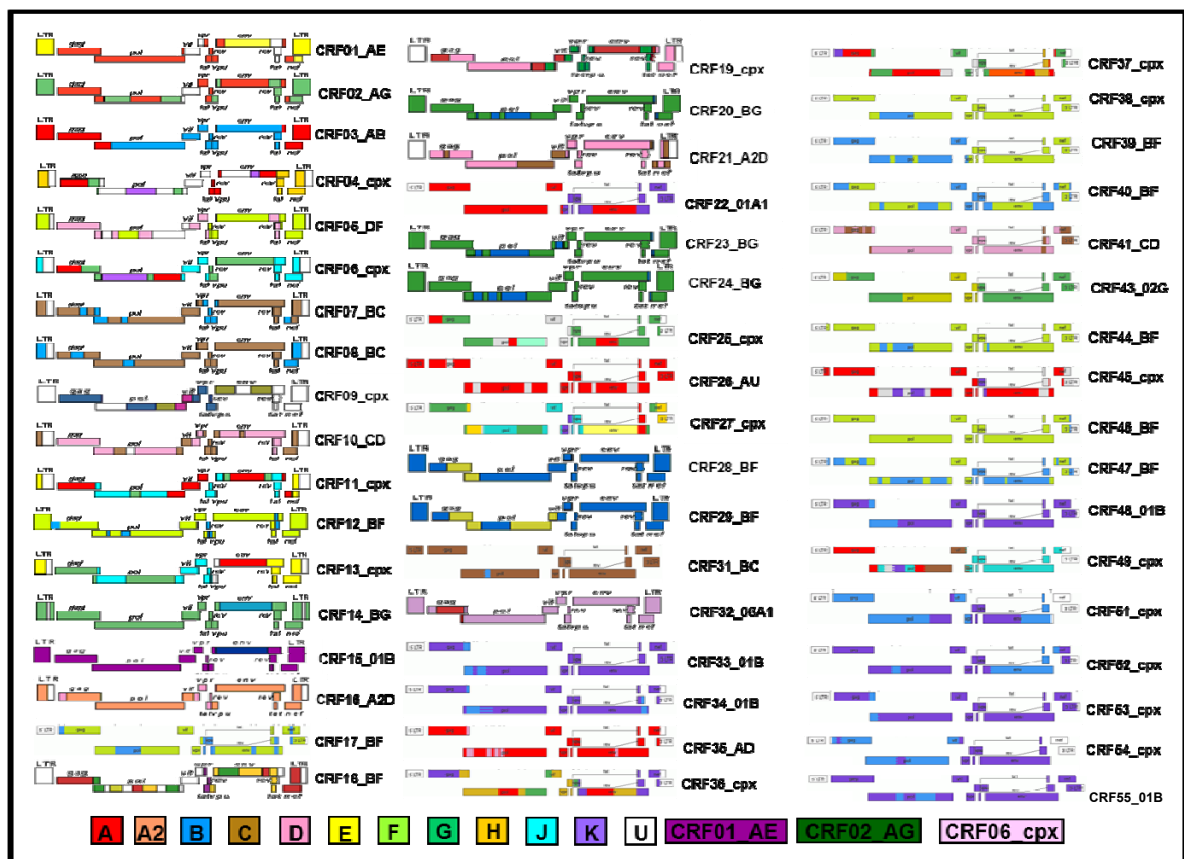
#### 1.9.1.1. Formas recombinantes circulantes

Para la identificación de una forma recombinante circulante (*circulating recombinant form*, CRF) es necesario caracterizar la estructura en mosaico del virus recombinante en tres individuos no relacionados epidemiológicamente entre sí. Se deben obtener secuencias casi completas del genoma ( $\geq 8$  Kb) en al menos dos de ellos, las cuales deben presentar el mismo patrón de puntos de recombinación a lo largo de todo el genoma viral y agrupar entre sí en árboles filogenéticos (326, 395). El tercer virus puede caracterizarse en un segmento parcial del genoma, debiendo confirmar el patrón de recombinación determinado en los genomas completos.

En el año 1999 se adoptó el sistema de nomenclatura actualmente utilizado para las CRFs (395). Estas se designan con las siglas CRF, seguidas del número consecutivo según el orden de descubrimiento, y a continuación las letras de los subtipos parentales, o, si estos son más de dos, cpx (de *complex* o complejo). Los segmentos que no agrupan con subtipos conocidos se designan U (de *unknown* o desconocido), que se encuentran frecuentemente en recombinantes originados en África central. Algunas CRFs son recombinantes de segunda generación, que derivan de recombinación secundaria de un CRF con un subtipo, y estas son designadas con el número del CRF y el subtipo parental. Por ejemplo, CRF15\_01B (476), originado en Tailandia de la recombinación de la CRF01\_AE y el subtipo B.

El primer caso de recombinación intersubtipo, descrito en 1994, fue detectado en Brasil en dos individuos que eran pareja sexual y portadores de un virus recombinante BF (403). Un año más tarde, se describió una elevada frecuencia (10%) de virus recombinantes intersubtipo en las secuencias depositadas en las bases de datos. En el año 1996 se caracterizó la primera CRF, mediante el

análisis de la secuencia completa de una forma genética circulante en Tailandia y África central, que mostró que estos virus tenían una estructura recombinante entre el subtipo A y otro hipotético denominado E, solamente conocido por el fragmento presente en la forma recombinante circulante, que posteriormente recibió la designación de CRF01\_AE (92, 182). Hasta el momento actual se han descrito 55 CRFs cuyas estructuras en mosaico y secuencias de referencia se encuentran disponibles en la base de datos de secuencias de VIH de Los Alamos (Figura 12) (14).



**Figura 12.** Estructuras de genomas de formas recombinantes circulantes (CRF) del VIH-1 disponibles en la base de datos de VIH de Los Álamos (14). Cada color representa el subtipo o CRF parental del segmento correspondiente.

El grado de propagación de las CRFs es muy variable, y sólo unas pocas se han extendido como formas con alta prevalencia en un área geográfica amplia (326): CRF01\_AE en el sudeste de Asia y ciertas zonas de China (85, 335, 375), CRF02\_AG en África occidental y central (93, 311), CRF07\_BC y CRF08\_BC en China (361, 444), CRF12\_BF en Argentina y Uruguay (466, 470) y CRF35\_AD en Irán y Afganistán (410, 434).

#### **1.9.1.2. Formas recombinantes únicas**

Las formas recombinantes únicas (URF) se definen como formas recombinantes encontradas en un único individuo o un grupo de individuos relacionados epidemiológicamente entre sí. Se detecta una alta frecuencia y diversidad de URFs en áreas geográficas donde circulan diferentes formas genéticas de VIH-1 en la misma población y pueden producirse por la recombinación entre diferentes subtipos de VIH-1, entre CRFs, entre subtipos y CRFs, entre distintas variantes filogenéticas de un mismo subtipo o entre grupos M y O (325, 471). El incremento en la prevalencia de URFs prueba la alta frecuencia de infecciones dobles (incluyendo las reinfecciones) con las diferentes variantes que circulan localmente (236, 285, 326, 432, 467). Probablemente, la prevalencia real de URFs está subestimada por el análisis de secuencias parciales del genoma (296, 326). Se ha descrito alta prevalencia de URFs en Ghana (130), Togo (520), Nigeria (297), y Níger (283) (África occidental); RDC (501), Camerún (94), Gabón y Angola (32) (África central occidental); Tanzania (217, 382), Kenia (150), y Uganda (208) (África oriental); Myanmar (444, 452), China (519), Tailandia (475) y Malasia (274, 459) (Asia oriental y sudoriental); Galicia (467) y Portugal (164, 165) (Europa occidental); Estonia (38) (Europa oriental); Argentina (91, 425, 470), Uruguay (466), y Brasil (469) (América del Sur); y Cuba (117, 349) (Caribe).

La prevalencia de la recombinación intrasubtipo en VIH-1 es desconocida por la dificultad para distinguir entre diferentes variantes virales del mismo subtipo. Sólo es posible su detección cuando se caracterizan los virus parentales de los que derivan estos virus recombinantes o cuando virus del mismo subtipo presentan agrupamientos filogenéticos distintos en diferentes segmentos del

genoma (326). En virus de subtipo C de África se ha estimado que cerca del 40% son recombinantes intrasubtipo (399).

### **1.9.2. Distribución geográfica y prevalencia de las formas genéticas del VIH-1**

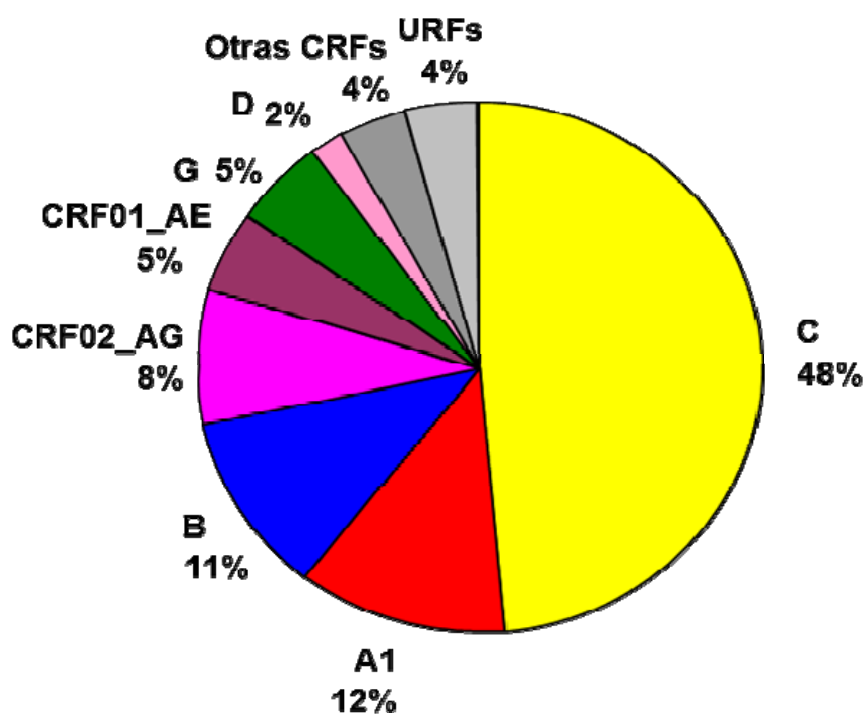
La mayor diversidad genética de VIH-1 está en África central occidental, en donde circulan los 4 grupos del VIH-1, todos los subtipos y subsubtipos (excepto el B) y múltiples CRFs y URFs, posiblemente como consecuencia del origen de la epidemia en esta región. Fuera de África central occidental, en la mayoría de los países predomina un número limitado de formas genéticas de VIH-1, generalmente una a tres, que derivan de distintas introducciones o representan recombinantes generados localmente. Frecuentemente, la primera forma genética introducida en un área geográfica se establece en la población como forma predominante sobre las formas genéticas que se introduzcan después. Este fenómeno se denomina “efecto fundador” (222). Sin embargo, en ocasiones la forma genética de VIH-1 predominante es sustituida por otra. Un ejemplo es la epidemia en Tailandia con dos introducciones distintas de VIH-1: en 1988 se detectó el subtipo B entre UDIs y en 1989 la CRF01\_AE en población heterosexual promiscua; sin embargo, desde mediados de la década de 1990 predomina la CRF01\_AE tanto en la población infectada por vía sexual como entre UDIs (355, 445).

La prevalencia estimada de las formas genéticas del VIH-1 en la pandemia es muy variable. En un estudio publicado recientemente (85, 210, 211), solamente 7 formas genéticas del VIH-1 presentan una prevalencia global mayor del 1%: los subtipos A, B, C, D y G, y las formas recombinantes CRF01\_AE y CRF02\_AG (Figura 13). De todas ellas, la más prevalente es el subtipo C, que representa aproximadamente la mitad (48%) de las infecciones por VIH-1 en el mundo, seguida del subsubtipo A1 (12%), subtipo B (11%), CRF02\_AG (8%), CRF01\_AE (5%), subtipo G (5%) y subtipo D (2,5%). Otras CRFs representan en conjunto el 4%, las URFs el 4% y los demás subtipos menos del 1%. Las formas recombinantes representaban en conjunto el 20% de las infecciones. Es importante mencionar que estos estudios analizan segmentos pequeños del genoma viral, por lo que la proporción de URFs, cuya frecuencia aumenta con

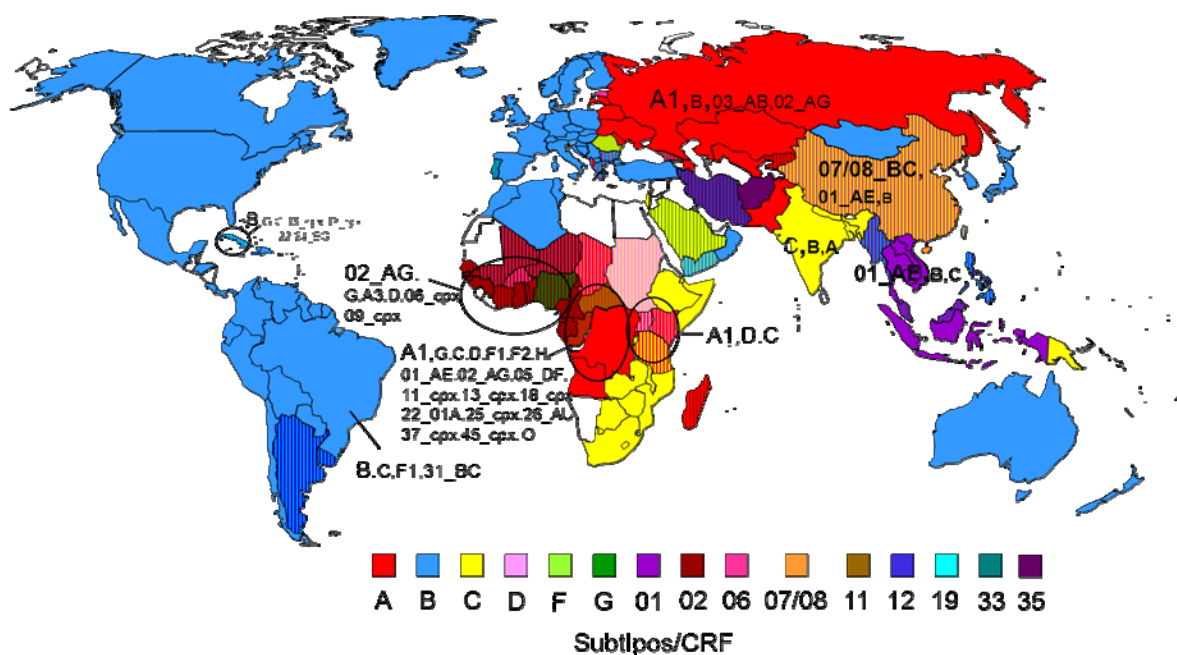
la longitud del segmento analizado, probablemente sea bastante mayor de la estimada.

La distribución geográfica de las formas genéticas más prevalentes en el mundo se presenta en la Figura 14: el subtipo C en el sur, este de África, India, sudeste de Asia y sur de Brasil (73, 85, 208, 433); el subtipo A en África central y oriental (Kenia, Uganda, Ruanda y Tanzania) y en los países de la Antigua Unión Soviética (85, 150, 208); el subtipo B en América, Europa occidental y central y Australia, en algunos países del sudeste Asiático, Corea, el norte de África, oriente medio y entre la población homosexual de Rusia (85); CRF02\_AG en África occidental y central (311); CRF01\_AE en el sureste de Asia y algunas zonas de China (85, 335); el subtipo G en África central y occidental, con una alta prevalencia en Nigeria (343), en Portugal y, como forma minoritaria, en España, sobre todo en Galicia (134, 165, 467), y en Cuba (117).

Otras formas genéticas de VIH-1 menos prevalentes a escala global, pero prevalentes en epidemias locales, son el subtipo D en el este de África (Uganda, Tanzania y Kenia); el subtipo F en África central, Rumania y Brasil; CRF07\_BC y CRF08\_BC en China (298, 361, 444); CRF12\_BF en Argentina y Uruguay (85, 466, 470); CRF35\_AD en Afganistán e Irán; y CRF06\_cpx en Burkina Faso y Estonia.



**Figura 13.** Prevalencia global de las formas genéticas mayoritarias del VIH-1. Los subtipos F-K (no incluidos en la figura) representan en conjunto menos del 1% de las infecciones globales (85, 210, 211).



**Figura 14.** Distribución geográfica de las formas genéticas de VIH-1 más prevalentes en cada país. Los patrones barrados indican la presencia de una segunda forma genética con prevalencia  $\geq 20\%$  (las barras finas indican prevalencias del 20-39% y las gruesas de  $\geq 40\%$ ). Se señalan áreas geográficas en las que circulan múltiples formas genéticas. Los países sobre los que no hay datos publicados están en blanco.

### 1.9.3. Superinfección por VIH-1

La superinfección ocurre cuando un individuo infectado con VIH-1 adquiere una nueva infección con una cepa distinta procedente de un individuo diferente un tiempo después, a pesar de una respuesta inmune establecida por la infección inicial (73, 121, 195, 432, 483). La coinfección puede definirse como la infección de un individuo por dos virus distintos derivados de diferentes individuos de forma simultánea o dentro de un período corto, antes que la infección con el primer virus se haya establecido y se desarrolle una respuesta inmune (Figura 7) (121, 191, 326).

El término reinfección es utilizado de forma alternativa al de superinfección, debido a que el término *super* podría sugerir de forma errónea que la segunda



infección implica mayores niveles de replicación viral que la primera (326, 432). La superinfección es de particular interés debido a que demuestra que la infección natural por VIH-1 no siempre desarrolla una respuesta inmune protectora frente a posteriores exposiciones, generando preguntas importantes respecto a la susceptibilidad a reinfecciones y su efecto en el desarrollo de una vacuna frente al SIDA (121, 326). La superinfección por distintas formas genéticas implica que las respuestas inmunes inducidas por una forma genética del VIH-1 no protegerán frente a la infección con otra forma genética. Además la frecuencia con que ocurre la superinfección es desconocida (357). La superinfección puede generar nuevas formas recombinantes o la sustitución del primer virus por el nuevo re infectante de forma predominante (471).

La superinfección es un mecanismo generador de variabilidad genética producto de la recombinación que se origina en células infectadas por más de un virus, resultando en la emergencia de virus con un elevado *fitness* biológico, cepas más virulentas, con diferente tropismo o resistentes a fármacos antirretrovirales (73, 121, 326). Por lo tanto, la superinfección o reinfección tiene importancia en la patogenia de la enfermedad, en el tratamiento y en el desarrollo de vacunas.

Un dato que sugiere que la superinfección por VIH-1 es frecuente es la frecuente detección de URFs en la población de áreas geográficas donde circulan múltiples variantes virales (121), ya que cada URF deriva de una infección con dos o más virus genéticamente distintos (488). En algunos casos, la superinfección se ha asociado con un incremento en la carga viral, resistencia a fármacos antirretrovirales y rápida progresión de la enfermedad (121, 191, 194). Sin embargo, se desconoce cuáles son producidas por coinfección o por superinfección (236) y su frecuencia dependerá de la prevalencia del VIH-1 en la población y el número de exposiciones al virus (139). Los primeros casos de superinfección por VIH-1 se describieron en 2002 (44, 236, 376), posteriormente ha ido en incremento su identificación particularmente en grupos de riesgo como HSH, UDIs y prostitutas (121).

## **1.10. IMPLICACIONES BIOLÓGICAS Y CLÍNICAS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE VIH-1**

El estudio de la variabilidad genética de VIH-1 es útil para determinar la propagación de la epidemia, pero también es relevante para la patogenia viral, transmisión, terapia antirretroviral (ARV), diagnóstico o desarrollo de vacunas. Aunque se han demostrado algunas correlaciones biológicas de formas genéticas del VIH-1, aún quedan por definir múltiples aspectos de la significación biológica de la diversidad genética de VIH-1.

### **1.10.1. Pruebas diagnósticas**

La variabilidad genética de VIH-1 afecta la especificidad y sensibilidad de las pruebas serológicas y el diagnóstico molecular, pudiendo ser un factor de riesgo para la transmisión de las infecciones no identificadas. Es importante que toda prueba comercial sea capaz de diagnosticar infecciones por subtipos B y no B y formas recombinantes.

El inmunoensayo para VIH de cuarta generación permite la detección de antígeno p24 y anticuerpos frente a VIH en una sola prueba, reduciendo el intervalo de seroconversión (508). Estudios recientes han demostrado que estos inmunoensayos pueden identificar la mayoría de subtipos del grupo M, las CRF01\_AE y CRF02\_AG, virus del grupo O y VIH-2 (262). El diagnóstico molecular por RT-PCR en tiempo real utilizado para la cuantificación de carga viral (ARN viral plasmático) es capaz de identificar todos los subtipos del grupo M con un nivel de detección de < 50 copias/ml (450). Sin embargo estos ensayos tienen mayor dificultad para detectar y cuantificar de manera fiable las variantes genéticas más diversas procedentes de África, especialmente el grupo O (398).

### **1.10.2. Características biológicas *in vitro***

El estudio de las correlaciones biológicas *in vitro* de las formas genéticas de VIH-1 se ha enfocado en algunos aspectos particulares de la biología viral, principalmente en la actividad transcripcional, uso de correceptores y la capacidad replicativa del virus.

#### **1.10.2.1. Actividad transcripcional del promotor**

El análisis de secuencias de LTR de VIH-1 ha demostrado variación intersubtipo en los dominios de unión a factores de transcripción celular. Una de las diferencias más notables es el número de sitios de unión al factor de transcripción NF- $\kappa$ B: mientras casi todos los subtipos tienen dos sitios de unión, la mayoría de los aislados de subtipo C tiene tres y los virus CRF01\_AE uno (309). Algunos estudios han sugerido que estas diferencias resultan en diferentes actividades transcripcionales de los promotores, aunque solamente se ha encontrado una diferencia uniformemente reproducible, que es una respuesta reducida del LTR de CRF01\_AE a TNF $\alpha$  (229, 269, 307, 308, 372), una citoquina que estimula la transcripción del VIH-1 activando NF- $\kappa$ B, lo cual se refleja en una replicación viral reducida en presencia de NF- $\kappa$ B (491). Algunos autores han sugerido que se produce una mayor activación del LTR de subtipo C por TNF $\alpha$  y NF- $\kappa$ B (307, 309), lo cual podría contribuir a una mayor eficiencia de la transmisión del subtipo C a través de la activación de la replicación viral por los niveles elevados de TNF $\alpha$  en las secreciones cervicovaginales de mujeres con infecciones transmitidas por vía sexual (307). Sin embargo, otros autores no han podido reproducir estos resultados (229, 372).

#### **1.10.2.2. Utilización de correceptores**

En estudios iniciales en pacientes infectados con subtipo B se observó que en las etapas iniciales y asintomáticas los virus son casi uniformemente R5/NIS, cambiando a X4 o R5X4/IS en las etapas tardías en aproximadamente la mitad de los pacientes (313, 461). Posteriormente, se observó que este cambio de correceptor también ocurría frecuentemente en otros subtipos (345, 478, 524), excepto en los virus de subtipo C en los que este cambio es poco frecuente (31, 106, 345, 360, 478), aunque en un estudio se describió que en pacientes en estadios tardíos de la infección en tratamiento ARV el 50% de los virus era CXCR4-trópico (234). Una infrecuente utilización de CCR5 también se ha descrito recientemente para el subtipo G (384). Por el contrario, en los virus de la CRF14\_BG se ha observado que son mayoritariamente X4 o R5X4 independientemente del estadio de la enfermedad (347). También se ha

descrito una mayor frecuencia de tropismo a CXCR4 en el subtipo D que en el subtipo A (225, 240).

#### **1.10.2.3. Capacidad replicativa *in vitro***

Se han observado diferencias en la capacidad replicativa (*fitness* biológico) *in vitro* entre subtipos. Concretamente, los aislados primarios R5 de subtipo C tienen una cinética de replicación más lenta en linfocitos CD4<sup>+</sup> primarios comparada con virus R5 de otros subtipos (48, 58). Algunos autores han sugerido que la cinética de replicación lenta puede resultar en una mayor supervivencia, que incrementaría la oportunidad de transmitir el virus y contribuiría a aumentar la expansión global del subtipo C. Sin embargo, se ha descrito que la progresión de la enfermedad es similar en subtipo A y C (495). En estudios con virus de la CRF02\_AG se ha observado una capacidad replicativa mayor que en virus de subtipo A o G, independientemente del estadio de la enfermedad o uso de correceptores (253, 332), que se correlaciona con la gran expansión de CRF02\_AG en África occidental en comparación con los subtipos parentales. En VIH-1 del grupo O y en VIH-2 se ha observado una capacidad replicativa unas 100 veces menor que en virus del grupo M (48), que se correlaciona con la capacidad mucho más limitada de propagación de estos virus.

#### **1.10.3. Biología viral *in vivo***

Algunos estudios han encontrado asociación de las formas genéticas de VIH-1 con carga viral plasmática, progresión de la enfermedad y transmisión.

##### **1.10.3.1. Carga viral**

Se ha descrito que en infecciones con el subtipo C en Etiopía, la carga viral en el primer mes después de la seroconversión es menor que en infecciones con el subtipo B en Holanda (390). En Tailandia y Suecia, respectivamente, dos estudios han encontrado una carga viral plasmática postseroconversión en UDIs infectados con CRF01\_AE más elevada que en infectados con subtipo B (223, 250). En Ghana, se han observado cargas virales más elevadas en infecciones con CRF02\_AG comparadas con las causadas por virus de subtipos A y G, y recombinantes secundarios de la CRF02\_AG (416).

### 1.10.3.2. Progresión clínica

Las infecciones por VIH-2, comparadas con las infecciones por VIH-1, presentan una progresión más lenta (289), lo cual está asociado con una carga viral plasmática baja (45, 289, 369), y una reducida capacidad replicativa *in vitro* (48). Varios estudios en África oriental han evidenciado una más rápida progresión de la enfermedad en infecciones con el subtipo D que con subtipo A (54, 239, 252, 299, 495). Una más rápida progresión asociada a infección con el subtipo D, comparado con los subtipos A, B y C y la CRF02\_AG, también se observó en un estudio europeo (157). El subtipo D también se asoció con más frecuente desarrollo de demencia en individuos con inmunosupresión avanzada, comparado con el subtipo A (404). En Brasil se ha descrito una progresión más lenta de la enfermedad en infecciones con virus del subtipo B<sub>Br</sub>, que tienen la secuencia GWGR en el dominio hipervariable de V3, comparado con virus de subtipo B con la secuencia consenso GPGR (101, 124, 412).

### 1.10.3.3. Transmisión

Con respecto a la transmisión, se ha demostrado frecuencias más bajas de transmisión en infecciones por VIH-2, tanto por contacto heterosexual (187, 242) como de madre a hijo (37), ambas relacionadas con cargas virales más bajas que en infección por VIH-1 (334, 369). Sin embargo, las diferencias entre los subtipos del grupo M de VIH-1 han sido más difíciles de demostrar, pero se han descrito en algunos estudios. Así, en un estudio en Uganda se encontró que el subtipo A tenía una mayor transmisión heterosexual que el subtipo D (251). Este hecho contribuye al descenso en la proporción de infecciones por subtipo D y al incremento de las causadas por subtipo A en Uganda y Kenia, asociada tanto a una menor transmisibilidad del subtipo D y una más rápida progresión de la enfermedad y a una menor transmisión heterosexual comparado con el subtipo A (112). En cuanto a la transmisión perinatal se han descrito algunas diferencias en algunos estudios en Tanzania, donde se encontró una mayor transmisión del subtipo C y recombinantes intersubtipo que el subtipo D (74, 381), una mayor transmisión *in útero* del subtipo C que los subtipos A y D (380), y por lactancia materna de virus recombinantes intersubtipo que subtipo C o subtipos A, C y D (258).

#### **1.10.4. Correlaciones de subtipos de VIH-1 con susceptibilidad a respuestas inmunes**

El principal reto para el desarrollo de una vacuna frente al VIH-1 es la elevada diversidad genética del virus. La correlación de protección inmune frente a infección por VIH-1 se conoce incompletamente, pero la idea generalmente aceptada es que una vacuna eficaz frente al VIH-1 debería inducir respuestas tanto celulares como humorales potentes, amplias y duraderas.

La mayoría de los estudios iniciales en los que se analizó la susceptibilidad a anticuerpos neutralizantes utilizando sueros de individuos infectados por VIH-1 concluyó que los subtipos de VIH-1 no se corresponden con serotipos (84, 257), excepto la variante de CRF01\_AE que circula en el sudeste de Asia que se correlacionaba con un serotipo (294). Estos estudios presentaban ciertas limitaciones como la utilización de sueros con escasa capacidad neutralizante contra aislados primarios de VIH-1, un número reducido de aislados de cada subtipo o en algunos casos la falta de caracterización genética de la envuelta completa, lo que dejaba abierta la posibilidad de que algunos virus clasificados como pertenecientes a un subtipo fueran en realidad recombinantes. En contraste con estos resultados, múltiples estudios posteriores, utilizando un número mayor de virus de cada subtipo o de pseudovirus generados a partir de clones funcionales de la envoltura, han detectado una neutralización preferente intrasubtipo, con una tendencia a que los anticuerpos neutralizantes frente a los virus de un subtipo sean más efectivas contra virus del mismo subtipo que ha inducido tal respuesta (70, 84, 273, 421, 428, 489), aunque también se ha detectado un grado importante de neutralización cruzada intersubtipo.

Varios estudios han mostrado la presencia de reactividades cruzadas de CTLs frente a diferentes subtipos en individuos infectados por VIH-1. Sin embargo múltiples estudios también han mostrado, al igual que con los anticuerpos neutralizantes, respuestas intrasubtipo preferentes, que son más potentes y se detectan con más frecuencia frente al mismo subtipo que lo ha inducido (65, 89, 113, 118, 180, 299), así como la neutralización preferente de aislados de Sudáfrica en un estudio en el que la mayoría de los virus y sueros utilizados correspondían a un *cluster* local de subtipo C exclusivo de este país (86).

Los estudios sobre protección cruzada en animales son escasos debido a que el chimpancé, el único primate no humano susceptible de infección por VIH-1, se ha utilizado escasamente para estudios de vacunas debido a su alto costo, escasa disponibilidad y generalmente escaso potencial patogénico. En un estudio, dos chimpancés vacunados con una vacuna recombinante de la envuelta (rgp120) y un péptido de la región V3 de la envoltura de subtipo B no quedaron protegidos frente a CRF01\_AE, aunque dicha vacuna protegía frente a un virus heterólogo de subtipo B adaptado a líneas celulares linfoides T (188).

A falta de un modelo animal adecuado en simios otros lentivirus que infectan otras especies con diversidades genéticas comparables a las del VIH-1 pueden ser de utilidad. Un estudio con una vacuna atenuada del virus de la anemia infecciosa equina (EIAV) demostró una correlación linear inversa entre la eficacia de la vacuna para prevenir la enfermedad y la divergencia genética en la glicoproteína superficial de la envoltura (gp90) entre el virus de desafío y el virus vacunal (115). Por otra parte, las vacunas del virus de la inmunodeficiencia felina (FIV) de subtipo único sólo han sido eficaces contra virus de desafío derivados de cultivos *in vitro* homólogos o del mismo subtipo (481).

En resumen, aunque se observan frecuentes reactividades cruzadas entre subtipos, las respuestas inmunes tanto celulares como humorales se dirigen preferentemente hacia el mismo subtipo que las ha inducido. También se observa una tendencia a respuestas preferentes dentro de *clusters* o variantes intrasubtipo. Los escasos resultados en modelos animales de infección por lentivirus también sugieren que la proximidad genética entre el virus vacunal y el de desafío aumenta la eficacia de la vacuna. Los resultados de los distintos estudios indican que los inmunógenos utilizados en una vacuna frente al VIH-1 deberían estar genéticamente lo más próximos que sea posible a las variantes que circulan en la población en las que se utilice o que se deberían utilizar vacunas multivalentes que incorporen entre sus componentes inmunógenos derivados de las variantes que circulen localmente en las zonas en las que se aplique.

### 1.11. FÁRMACOS ANTIRRETROVIRALES

Los fármacos antirretrovirales (ARV) son los medicamentos utilizados para el tratamiento de la infección por VIH. Actualmente, la Administración sobre Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos (*Food and Drug Administration*, FDA) ha aprobado el uso de 24 fármacos ARV, cuyas dianas terapéuticas están dirigidas hacia distintas etapas del ciclo de replicación viral: fusión, entrada, transcripción inversa, integración y maduración (Tabla 2) (19, 20, 136, 389, 413, 456).

El objetivo principal del tratamiento antirretroviral (TARV) es suprimir la replicación viral de modo rápido y duradero, con el consiguiente descenso de la carga viral plasmática a niveles indetectables, además de restaurar o preservar el sistema inmune de los individuos infectados, a pesar de la imposibilidad de erradicar el virus (110, 136, 389).

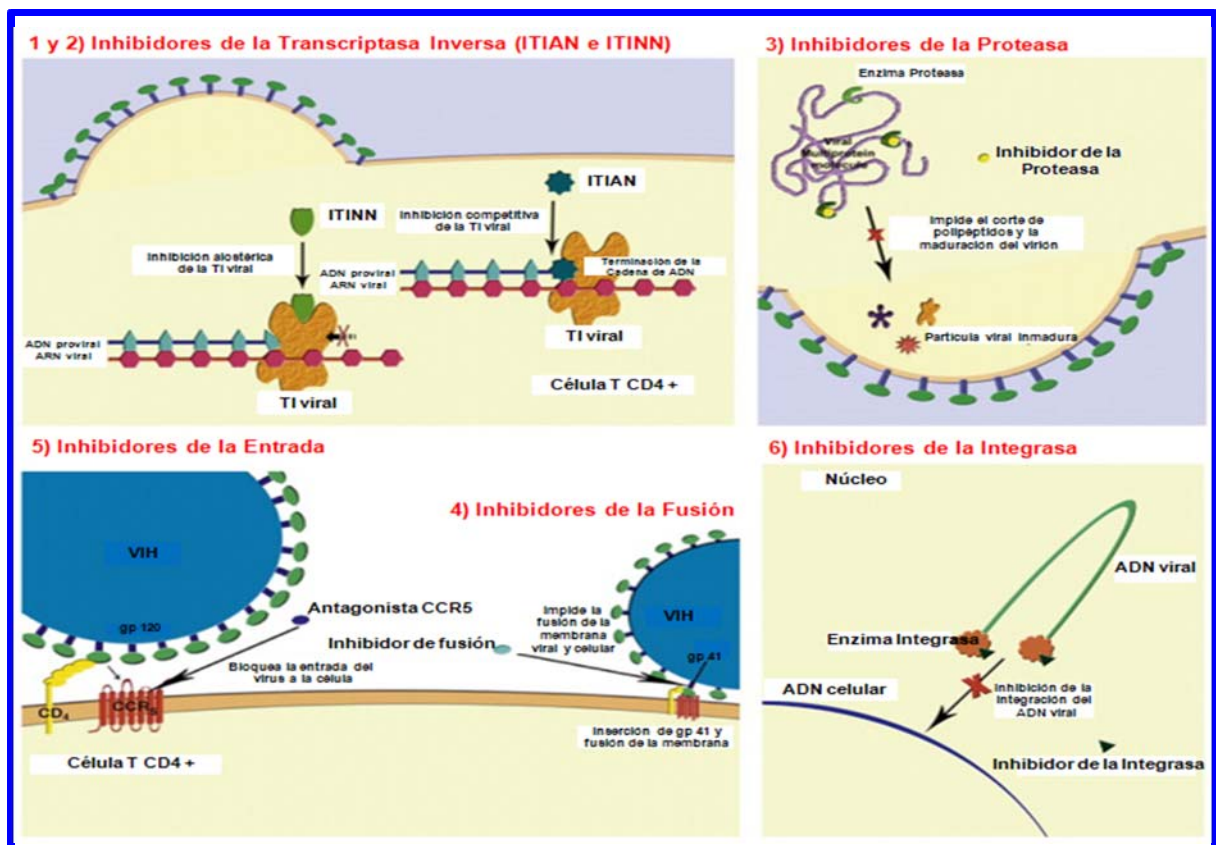
En 1994 el TARV se basaba en regímenes terapéuticos que utilizaban un solo medicamento, un inhibidor nucleósido o no nucleósido de la TI, sin que se obtuvieran los resultados esperados en los ensayos clínicos. En 1996, se introducen los inhibidores de la proteasa y posteriormente se combinan las terapias, cambiando radicalmente el panorama de evolución de la infección por VIH-1 desde una infección con pronóstico fatal a una infección crónica (30).



**Tabla 2.** Fármacos ARV aprobados por la FDA para el tratamiento de la infección por VIH (19, 20, 136, 389, 413, 456).

<b>Familia de Fármaco Antirretroviral</b>	<b>Nombre Genérico</b>	<b>Nombre Comercial</b>	<b>Año de Aprobación</b>
<b>Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos y nucleótidos (ITIAN) [7]</b>	Zidovudina (AZT, ZDV)	Retrovir	1987
	Didanosina (ddI)	Videx	1991
	Estavudina (d4T)	Zerit	1994
	Lamivudina (3TC)	Epivir	1995
	Abacavir (ABC)	Ziagen	1998
	Tenofovir (TDF)	Viread	2001
	Emtricitabina (FTC)	Emtriva	2003
<b>Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos (ITINN) [5]</b>	Nevirapina (NVP)	Viramune	1996
	Delarvidina (DLV)	Rescriptor	1997
	Efavirenz (EFV)	Sustiva	1998
	Etravirina (ETR)	Intelence	2008
	Rilpivirina (RPV)	Edurant	2011
<b>Inhibidores de la proteasa (IP) [9]</b>	Saquinavir (SQV)	Fortovase	1995
	Ritonavir (RTV)	Norvir	1996
	Indinavir (IDV)	Crixivan	1996
	Neflnavir (NFV)	Viracept	1997
	Amprenavir (APV)	Agenerase	1999
	Lopinavir/ritonavir (LPV/r)	Kaletra	2000
	Atazanavir (ATV)	Reyataz	2003
	Fosamprenavir (FPV)	Lexiva	2003
	Tipranavir (TPV)	Aptivus	2005
	Darunavir (DRV)	Prezista	2006
	Enfuvirtide (T20)	Fuzeon	2003
<b>Inhibidores de fusión (1)</b>			
<b>Inhibidores de entrada (1)</b>	Maraviroc (MVC)	Selzentry	2007
<b>Inhibidores de la integrasa (InInt) [1]</b>	Raltegravir (RAL)	Issentress	2007

Los fármacos ARV se clasifican según su mecanismo de acción en seis clases o familias: **1)** Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos y nucleótidos, **2)** Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos, **3)** Inhibidores de la proteasa, **4)** Inhibidores de la fusión, **5)** Inhibidores de la entrada, e **6)** Inhibidores de la integrasa (Figura 15) (19, 136, 243, 249, 389, 413, 456).



**Figura 15.** Mecanismo de acción de los fármacos ARV utilizados para el tratamiento de la infección por VIH (249).

### 1) Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos y nucleótidos (ITIAN)

La Zidovudina (AZT) fue el primer fármaco ARV disponible para el tratamiento de la infección por VIH-1. Los ITIAN tienen su efecto antiviral en una etapa temprana del ciclo de replicación, inhibiendo la enzima viral TI responsable de catalizar la síntesis de ADN utilizando como molde el genoma viral de ARN.

Estos fármacos son análogos sintéticos de nucleósidos y nucleótidos que compiten con el sustrato natural (fisiológico) de la enzima viral TI, los trifosfatos de nucleótidos (dNTPs) necesarios para la síntesis del ADN proviral, de manera que al unirse al sitio activo de la TI se incorporan a la cadena de ADN en elongación, interrumpiendo la polimerización por la ausencia de un grupo 3'-OH libre que permita que continúe la extensión, y como consecuencia se detiene la replicación viral (429).

Los ITIAN se dividen en análogos de bases purínicas (adenosina y guanosina) y análogos de bases pirimidínicas (timidina y citidina). Estos fármacos requieren tres fosforilaciones en el interior de la célula para activarse. Existe un solo fármaco (Tenofovir) análogo de nucleótidos (análogo de adenina), que requiere una fosforilación menos para activarse. Todos los ITIAN necesitan ser modificados por enzimas celulares para activarse (429).

Se han comercializado un total de 8 ITIAN, uno de los cuales (Zalcitabina o ddC) se retiró del mercado por su toxicidad y compleja posología (19).

## **2) Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos (ITINN)**

Los ITINN también tienen su efecto antiviral en una etapa temprana del ciclo de replicación. Son fármacos que inhiben la TI por un mecanismo no competitivo. Se unen directamente y de forma reversible al centro catalítico de la enzima viral o en un lugar cercano al mismo, provocando un cambio conformacional en la enzima e inhibiendo su actividad ADN polimerasa. A diferencia de los ITIAN, los ITINN son directamente activos, sin necesidad de ser modificados por enzimas celulares.

Los fármacos pertenecientes a esta familia son un grupo muy diverso químicamente, que no tiene relación entre ellos. Son específicos del VIH-1, y no son activos frente a cepas del VIH-1 del grupo O, ni VIH-2, ni SIV, ni otros lentivirus.

### **3) Inhibidores de la proteasa (IP)**

Los IP bloquean la proteasa impidiendo la maduración de las partículas virales e inhibiendo de forma potente la replicación viral. La proteasa es una enzima viral que actúa cortando las proteínas precursoras de Gag y Gag-Pol para formar las proteínas funcionales. La inhibición de la proteasa no impide que se sintetizen los polipéptidos virales, pero al no producirse proteínas funcionales, se generan virus no infectivos. Los IP tienen una estructura química parecida a los péptidos virales que son sustrato de la proteasa, con una elevada afinidad por el dominio activo de la misma, inhibiendo su actividad catalítica. Actúan de forma directa, sin necesitar ninguna transformación en la célula (43).

### **4) Inhibidores de la fusión**

En el año 2003 se aprobó el único fármaco del que disponemos (Enfuvirtida o T-20). Es un péptido que se une en la membrana celular al dominio transmembrana de la glicoproteína viral gp41, inhibiendo los cambios conformacionales necesarios que permiten la fusión entre la membrana viral y celular, impidiendo la penetración de la nucleocápside viral en los linfocitos. Su actividad frente al VIH es independiente del correceptor utilizado (CCR5 y/o CXCR4).

Está indicado para tratamiento de pacientes con virus multirresistentes, porque no interacciona con otros medicamentos y actúa antes que el virus infecte a la célula. Al ser un péptido, no puede administrarse por vía oral y debe ser inyectado por vía subcutánea.

### **5) Inhibidores de la entrada**

Solo disponemos de un inhibidor de entrada, Maraviroc (MVC) aprobado en el año 2007. MVC está indicado en el tratamiento específico de la infección por VIH-1 con tropismo CCR5 detectable mediante una prueba de tropismo validado y en combinación con otros fármacos ARV. Actúa bloqueando la entrada del virus a las células no infectadas, al unirse al correceptor CCR5 de la membrana celular. No es eficaz frente a virus con tropismo dual, mixto o a CXCR4.

Hasta el momento actual el mecanismo principal de resistencia conocido es la emergencia de virus con tropismo CXCR4 preexistentes como población minoritaria al inicio del tratamiento. La información existente actualmente sobre la selección de mutaciones de resistencia a MVC en diferentes regiones de la glicoproteína de la envuelta gp120, se basa fundamentalmente en estudios *in vitro*, siendo muy escasos los datos obtenidos a partir de pacientes en tratamiento con MVC y no habiéndose definido actualmente un patrón de resistencias *in vivo* a dicho medicamento.

Al igual que los ITINN, los inhibidores de fusión y entrada son específicos del VIH-1.

#### **6) Inhibidores de la integrasa (InInt)**

Actualmente se dispone de un inhibidor de la integrasa aprobado para uso clínico, Raltegravir (RAL). Está pendiente de aprobación el Elvitegravir (EVG) y también están en fases avanzadas de desarrollo nuevos inhibidores de la integrasa de segunda generación, con un perfil de resistencias diferentes a los dos de primera generación.

Estos inhibidores actúan bloqueando la actividad de la integrasa, evitando que se unan los extremos reactivos del ADN viral al ADN celular. De esta forma aunque la célula esté infectada, es incapaz de realizar la transcripción a partir del provirus y de formar su genoma viral de ARN (366). Aunque RAL se aprobó inicialmente para uso solamente como terapia de rescate en pacientes que desarrollaban resistencias frente a otros ARV, desde 2009 está aprobado su uso en todos los pacientes, pudiéndose emplear como tratamiento de inicio en combinación con 2 ITIAN. También se ha mostrado eficaz frente al VIH-2.

A pesar de la larga lista de fármacos ARV disponibles, la imposibilidad de erradicar el virus, los requerimientos de adherencia, las toxicidades a largo plazo y el desarrollo de resistencias cruzadas entre clases o familias de fármacos, obligan a buscar nuevos ARV para el control duradero de la infección por VIH. Existen fármacos no comercializados, pero en fases avanzadas de investigación como son: el inhibidor de la integrasa EVG y Dolutegravir

(S/GSK1349572). También está en fase relativamente avanzada de investigación el inhibidor de la maduración Bevirimat (19, 136, 456).

La terapia ARV de alta eficacia (TAAE) se basa en combinaciones de tres fármacos, que deben incluir dos ITIAN y un ITINN o dos ITIAN y un IP o un InInt, aunque son posibles otras combinaciones (413). La TAAE constituye el tratamiento de inicio de elección de la infección crónica por VIH (19, 351, 389), permite un rápido descenso de la CVP 1-2 log a las 4 semanas de TARV, consiguiéndose CVP < 50 copias/ml a las 16-24 semanas. Además de obtener la restauración inmunológica, aumento de los linfocitos CD4<sup>+</sup> en las primeras semanas de tratamiento y disminución de los linfocitos CD8<sup>+</sup> y otros marcadores de activación del sistema inmune (19, 389), se consigue también un retraso en la progresión clínica (morbilidad e ingresos hospitalarios), reduciendo costos y aumentando la supervivencia.

Para prevenir el deterioro del sistema inmune el TARV debe iniciarse tan pronto como sea posible, considerando factores como el elevado costo del tratamiento, la toxicidad de los fármacos, la adherencia, los efectos secundarios y el hecho de que incluso si la terapia se inicia tarde el sistema inmune se puede recuperar (389). Se recomienda iniciar TARV en pacientes con infección por VIH sintomática. En pacientes asintomáticos la indicación de inicio se basa en los resultados de determinación de linfocitos CD4<sup>+</sup>, en la CVP y en las comorbilidades del paciente, teniendo en cuenta las siguientes consideraciones: **a)** con linfocitos CD4<sup>+</sup> inferiores a 350 células/μl se recomienda iniciar el TARV; **b)** con linfocitos CD4<sup>+</sup> entre 350 y 500 células/μl se recomienda el tratamiento, aunque se puede diferir su inicio en casos de número estable de CD4<sup>+</sup>, CVP baja o escasa predisposición del paciente; y **c)** en parejas serodiscordantes (19, 110). En el caso de los profesionales de la salud expuestos accidentalmente al VIH, se recomienda una combinación de dos ITIAN y un IP por un período de un mes, iniciándose entre las primeras cuatro horas y hasta las 72 horas después de la exposición accidental. En mujeres embarazadas infectadas por VIH la prevención de la transmisión vertical se basa en: previa determinación de resistencias a ARV administrar TAAE con el objetivo de mantener una CVP indetectable y en el parto AZT vía

endovenosa, cesárea programada (cuando la CVP es  $> 1,000$  copias/ml), tratamiento con AZT del niño durante 6 semanas y evitar la lactancia materna (19).

#### **1.11.1. Resistencia a fármacos ARV**

La gran variabilidad genética de VIH-1 permite la selección de mutaciones asociadas a resistencia cuando se utilizan concentraciones subinhibitorias de los fármacos ARV. Debido al uso generalizado de los ARV, hay un incremento en la selección de cepas resistentes en los individuos tratados y en la transmisión de estas variantes virales resistentes a la población.

La selección de mutantes resistentes depende en gran medida de la capacidad del fármaco de inhibir la replicación del virus, de manera que si no es capaz de suprimir la replicación, se favorecerá que las subpoblaciones mutantes resistentes pasen a constituir progresivamente poblaciones mayoritarias predominantes (351, 456). Las principales mutaciones de resistencia a las distintas clases o familias de fármacos ARV utilizados para el tratamiento de la infección por VIH se presentan en la Tabla 3.

Los cambios en el genoma del VIH responsables de la resistencia o reducción de la sensibilidad al fármaco pueden ser mutaciones puntuales (una o más que den lugar a un cambio de aminoácido), inserciones de material genómico adicional a la secuencia original, deleciones con pérdida de un fragmento de un gen, y recombinación que conlleva el intercambio de fragmentos de material genético entre dos viriones diferentes (351).

En el apartado de variabilidad genética se explicó que una *cuasiespecie* representa el conjunto de las variantes virales presentes en un individuo infectado. Las mutaciones que confieren resistencia pueden existir en estas *cuasiespecies*, pero representan una proporción mínima de la población viral hasta que son sometidas a la presión selectiva del fármaco, permitiendo que las variantes resistentes se conviertan en población dominante si no se suprime la replicación viral (19).

**Tabla 3.** Principales mutaciones asociadas a resistencia a fármacos ARV utilizados para el tratamiento de infección por VIH-1 (6, 456).

Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos y nucleótidos (ITIAN)													
Consenso	Mutaciones Discriminatorias <sup>a</sup>					Mutaciones de Análogos de Timidina (TAMs) <sup>b</sup>						MDR <sup>c</sup>	
	184 M	65 K	70 K	74 L	115 Y	41 M	67 D	70 K	210 T	215 T	219 K	69 T	151 Q
3TC	VI	R										Ins	M
FTC	VI	R										Ins	M
ABC	VI	R	E	VI F		L			W	FY		Ins	M
ddl	VI	R	E	VI		L			W	FY		Ins	M
TDF	***	R	E		F	L		R	W	FY		Ins	M
d4T	***	R E				L N		R	W	FY	QE	Ins	M
ZDV	*** ***		*	*		L N		R	W	FY	QE	Ins	M
Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos (ITINN)													
Consenso	100 L	101 K	103 K	106 V	138 E	181 Y	188 Y	190 G	230 M				
NVP	I	EP	NS A	M		CIV LCH		ASE	L				
EFV	I	EP	NS	AM		CIV	LCH	ASE	L				
ETR	I	EP			AGKQ	CIV	L	ASE	L				
RPV	I	EP			AGKQ C	IV L		ASE	L				
Inhibidores de la proteasa (IP)													
Consenso	30 D	32 V	33 L	46 M	47 I	48 G	50 I	54 I	76 L	82 V	84 I	88 N	90 L
ATV/r		I	F	IL	V	VM	L	VTALM		ATFS	V S		M
DRV/r		I	F		VA		V LM		V	F	V		
FPV/r		I	F	IL	VA		V	VTALM	V	ATSF	V		M
IDV/r		I		IL	V			VTALM	V	AFTS V		S	M
LPV/r		I	F	IL	VA	VM	V VT	ALM	V	AFTS	V		M
NFV	N		F	IL	V	VM		VTALM		AFTS V		DS M	
SQV/r						VM		VTALM		AT	V	S	M
TPV/r		I	F	IL	VA			VAM		TL	V		
Inhibidores de la integrasa (InInt)													
Consenso	66 T	92 E	138 E	140 G	143 Y	147 S	148 Q	155 N					
RAL	A	Q K	A	SA	RCH		HRK H						
EVG	IAK	Q	KA SA			G HRK		H					
DTG		Q	KA	SA		HRK							

Las mutaciones de resistencia asociadas a fármacos ARV están designadas según la posición numérica y código de aminoácido. La secuencia consenso de aminoácidos de la cepa salvaje (*wild type*) está representada por letras en la



parte superior, mientras las mutaciones de resistencia de los aminoácidos están en la parte inferior. Las mutaciones en rojo y negrita indican un alto nivel de resistencia o pérdida de susceptibilidad y respuesta virológica al fármaco ARV utilizado. Las mutaciones en negrita indican una reducida susceptibilidad y respuesta virológica, mientras las indicadas en texto normal tienen un bajo nivel de resistencia y contribuyen a reducir la susceptibilidad en combinación con otras mutaciones de la misma familia o clase de fármaco ARV. El asterisco indica un incremento en la susceptibilidad al fármaco si la mutación está presente. En la Tabla 2 esta una lista completa de los nombres de los distintos fármacos ARV y sus respectivas abreviaturas.

<sup>a</sup>Mutaciones discriminatorias: son las que permiten a la enzima viral TI discriminar entre los ddNTPs-ITIAN terminadores de la polimerización y el sustrato natural de la enzima viral TI, los dNTPs fisiológicos, evitando que los primeros se incorporen a la cadena de ADN en elongación y permitiendo que continúe la polimerización, y, en consecuencia, la replicación viral (456).

<sup>b</sup>Mutaciones de análogos de timidina: se llaman así porque son seleccionadas por los análogos de timidina zidovudina y estavudina. Facilitan la excisión mediante fosforólisis de un ITIAN-trifosfato que se ha incorporado a la cadena en elongación del ADN viral, desbloqueando así su polimerización (456).

<sup>c</sup>MDR: *multi-drug resistance*, mutaciones de resistencia a múltiples fármacos de diferentes clases.

Las mutaciones de resistencia detectadas en pacientes que no han tomado TARV se clasifican en resistencias naturales y resistencias transmitidas. Las resistencias naturales son consecuencia de la propia variabilidad genética del VIH-1. Las resistencias transmitidas se deben a la infección por una cepa resistente procedente del caso fuente (19, 71, 133, 323, 351, 456).

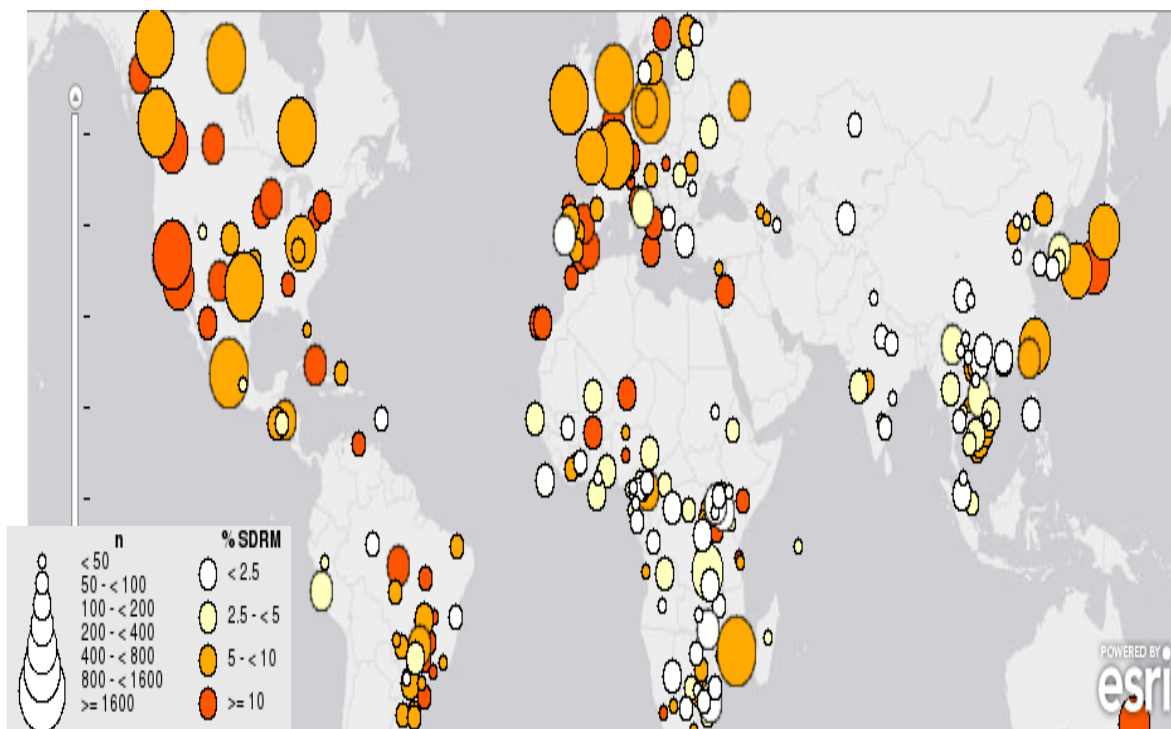
Las resistencias detectadas en pacientes en TARV se definen como resistencias adquiridas y se seleccionan por la presión selectiva ejercida por la exposición a fármacos ARV (19, 90, 133, 323, 351, 413, 456).

No todas las mutaciones de resistencia tienen la misma importancia. Para cada fármaco ARV existen las denominadas mutaciones primarias o principales, ligadas a la aparición de alto nivel de resistencia y a fracaso virológico y que además reducen el *fitness* biológico, y otras secundarias o compensatorias, que también contribuyen a la resistencia, aunque en menor medida, y que en general actúan mejorando la capacidad replicativa viral de las poblaciones con mutaciones primarias (19, 284, 291, 292, 327, 330, 413, 456).

Hay dos factores importantes a considerar en la selección de resistencias. Por un lado, la resistencia cruzada, entendiendo como tal el que una única mutación se asocie con resistencia a varios o incluso todos los fármacos de una misma familia (413), como es el caso de las mutaciones L100I y Y181I/C en la TI, que confieren resistencia a todos los ITINN, y I84V en la proteasa, que da lugar a la pérdida de actividad de 5 de los 9 IP disponibles (233). Por otro lado la barrera genética del fármaco, que es el número de mutaciones necesarias para conferir resistencia al fármaco y la facilidad o frecuencia con la que dichas mutaciones se desarrollan (456). Si para reducir la sensibilidad se requiere acumular múltiples mutaciones, se dice que el fármaco tiene una barrera genética alta. En cambio, cuando una sola mutación es suficiente para desarrollar un alto nivel de resistencia, se dice que la barrera genética es baja. La selección de virus resistentes a fármacos con barrera genética baja suele acontecer en solo semanas o meses, mientras los de barrera genética alta pueden requerir años (351). Los ITINN son un ejemplo de fármacos con una barrera genética baja y resistencia cruzada, ya que una única mutación se

asocia con un alto nivel de resistencia fenotípica a todos los fármacos de esta clase (136, 413, 456), como sucede por ejemplo con la mutación K101P. Otros ejemplos de fármacos con barrera genética baja son el ITIAN 3TC y el inhibidor de fusión T-20 (456). Sin embargo, la mayoría de los fármacos tienen una barrera genética intermedia y requieren varias mutaciones para disminuir significativamente su sensibilidad. Son pocos los fármacos que tienen barrera genética alta, entre ellos están dos ITIAN ddl y ddC y los IP Lopinavir y Darunavir (144, 388).

Se ha demostrado el desarrollo de resistencia frente a todos los fármacos ARV aprobados en la práctica clínica y se han identificado los patrones de mutaciones que dan lugar a estas resistencias (19, 291, 389, 413, 456). Diferentes estudios prospectivos han demostrado una mejor respuesta virológica en pacientes en los que se realizaron determinaciones de resistencia genotípica antes de iniciar la terapia, así como en pacientes con fracaso terapéutico (207, 305). También se ha demostrado la importancia de llevar a cabo estudios de resistencias transmitidas en la vigilancia epidemiológica de la infección por VIH (456, 512). En la Figura 16 se presenta un mapa con la prevalencia mundial de mutaciones de resistencia transmitida en población *naïve* (6).



**Figura 16.** Prevalencia por países de mutaciones de resistencia a antirretrovirales transmitidas en individuos infectados por VIH sin tratamiento ARV previo (6).

%SDRM: *surveillance drug resistance mutations*, vigilancia epidemiológica de mutaciones de resistencia transmitida.

El fracaso terapéutico se puede clasificar en virológico, inmunológico y clínico. Son varios los factores que influyen: **1)** factores del paciente, como la baja adherencia al tratamiento o intolerancia al medicamento; **2)** farmacológicos, entre los que destacan la baja barrera genética, la potencia del régimen terapéutico, los bajos niveles en sangre por malabsorción y las interacciones farmacológicas; y **3)** factores virales, como la presencia de variantes resistentes (19, 389). Se considera fracaso virológico dos determinaciones sucesivas de CVP > 50 copias/ml tras 6 meses de iniciada la terapia o tras haber conseguido previamente una CVP < 50 copias/ml (19, 389). Los sucesivos fracasos terapéuticos con acumulación de mutaciones de resistencia frente a diferentes familias de fármacos ARV limitan las posibilidades de éxito

del TARV, obligando al uso de regímenes más costosos y complejos, y se asocian con mayor incidencia de SIDA y muerte (19, 413, 456).

Al tratamiento tras el fracaso de al menos dos líneas de TARV se denomina terapia de rescate. En esta situación la mayoría de los enfermos ha experimentado fracaso con las tres familias de fármacos ARV más utilizados: ITIAN, ITINN e IP, recomendándose utilizar como primera opción de terapia de rescate los inhibidores de fusión, de entrada o de la integrasa (19, 365, 413, 456). Sin embargo debido a su alto costo también se recomienda utilizar fármacos ARV de regímenes previos que sean lo suficientemente potentes para reducir la carga viral por debajo del límite de detección, con barrera genética alta para evitar el rebote viral, con actividad antiviral residual y que no estén relacionados con el fracaso virológico y la selección de mutaciones de resistencia en el paciente (19, 456).

Diversos estudios han demostrado que los diferentes subtipos del grupo M tienen susceptibilidad similar a los fármacos ARV actualmente utilizados, que originalmente se desarrollaron para el subtipo B (76, 243, 291, 413, 456). Sin embargo se han documentado algunas diferencias en las frecuencias de algunas mutaciones de resistencia frente a ARV que se describen a continuación.

En virus de subtipo C y en CRF01\_AE se ha descrito la mutación V106M en TI (en vez de la V106A descrita en subtipo B) en pacientes tratados con Efavirenz y Nevirapina (137, 196, 221, 276, 337, 435, 447, 456, 506), confiriendo un alto nivel de resistencia a toda la familia de ITINN (79, 479, 487). En Uganda y Malawi se describió una mayor selección de mutaciones de resistencia asociada a Nevirapina en embarazadas infectadas con virus de subtipo C que las infectadas con virus de subtipo A y D (160, 162, 163). Las mutaciones de resistencia a ITIAN K65R y Y181C ocurren con menor frecuencia en subtipo A que en subtipos B y C (80, 148, 200, 220, 233, 358, 480, 505), y en proteasa se ha descrito la mutación de resistencia M89I/V en los subtipos C, F y G (33, 243). Otras mutaciones como D30N, asociada a resistencia a Nelfinavir tiene alta prevalencia en subtipo B pero no en subtipo C (149, 197, 244). La

mutación V82M ocurre con mayor frecuencia en subtipo G que en subtipo B (339, 451), mientras las mutaciones A98S y R211S han sido detectadas en aislados virales de subtipo G y en virus recombinantes BG de España (350). Además los virus del grupo O y VIH-2 son resistentes de forma natural a los ITINN debido a los polimorfismos Y181C y Y181I, respectivamente (374, 413, 438).

### **1.11.2. Detección de resistencias**

Las variantes resistentes pueden detectarse mediante técnicas genotípicas o fenotípicas. La técnica genotípica utilizada habitualmente es la secuenciación del genoma de VIH correspondiente a la diana de los fármacos antirretrovirales y la detección de las mutaciones de resistencia a los mismos, mientras que las fenotípicas determinan la respuesta de la población viral mayoritaria a concentraciones crecientes de los distintos fármacos (19, 456). Una limitación de la secuenciación es la dificultad de detección de las mutaciones de resistencia cuando la población mutada es < 20% de la población viral o la CVP es < 1,000 copias/ml (19, 456). La estandarización es uno de los principales problemas en la aplicación de las pruebas de detección de resistencias. Las consideraciones más importantes incluyen disponibilidad, costo, complejidad y nivel de experiencia necesaria. La secuenciación es más sencilla, rápida y accesible, y permite la detección de mutaciones puntuales antes de que se detecten cambios de susceptibilidad en las pruebas fenotípicas (19). Su mayor limitación es la dificultad de interpretación para algunos fármacos.

Las pruebas de resistencia deben realizarse durante el TARV activo, ya que la población viral resistente será sustituida por otra sensible a las pocas semanas de retirar los fármacos. Los resultados de estas pruebas se deben interpretar teniendo presente los estudios previos de resistencia, la historia terapéutica y la adherencia (389). Actualmente están disponibles dos pruebas comerciales genotípicas y fenotípicas: TRUGENE (Siemens, USA) (261) y ViroSeq (Celera) (161); y Phenosense (Monogram Biosciences) y Antivirogram (Virco), respectivamente (523). Además, para la detección de variantes minoritarias en la población se puede utilizar la ultrasecuenciación (507) y el ensayo de mutaciones puntuales (232).

Para la interpretación de las mutaciones asociadas a resistencia, existen diferentes sistemas de interpretación que utilizan algoritmos complejos basados en miles de secuencias con mutaciones de resistencia a los diferentes fármacos ARV, de las que se conoce su nivel de resistencia fenotípica y su relación con el fallo al tratamiento (385, 455, 456). Existen sistemas de interpretación que están disponibles *online* (6) a los que se puede enviar la secuencia obtenida y en la que detectan, cuantifican e interpretan todas las mutaciones de resistencia existentes y su nivel de resistencia a todos los fármacos antirretrovirales en uso clínico. Sin embargo, los algoritmos tienen una serie de limitaciones, ya que los patrones de mutaciones y las interacciones entre mutaciones son muy complejas y necesitan actualizaciones continuas. Existen además ciertas discrepancias entre los distintos algoritmos para la interpretación de un mismo genotipo, por lo que se necesita una interpretación estandarizada de los perfiles genotípicos. Por otro lado, aunque la mayoría de las infecciones en el mundo están causadas por virus de subtipo no B, la mayoría de los estudios sobre resistencias y de las técnicas de detección de las mismas se basan principalmente en el subtipo B, por ser el predominante en los países desarrollados (6, 291, 387, 456). En la Tabla 4 se presentan los estudios de mutaciones de resistencia a fármacos ARV realizados en Latinoamérica y el Caribe.

**Tabla 4.** Estudios de prevalencias de mutaciones de resistencia a fármacos ARV en Latinoamérica y el Caribe.

País	Año de Recolección	Población	n	% Resistencias			Referencia
				Pacientes Tratados <sup>a</sup>	Pacientes Naïve <sup>b</sup>	ITIAN, ITINN e IP	
México	2002-2003	Naïve	96		16%		(159)
México	2005-2010	Naïve	1655		7,4%		(51)
Belice	2001-2004 (año de nacimiento)	Niños naïve	11		27%	Todas con resistencia a ITINN	(341)
Guatemala	2010-2011	Naïve	145		8,3%		(52)
El Salvador	1989-2009 (año de nacimiento)	Niños, 15 tratados y 11 naïve	26	66,7%	10%	52%, 66,7% y 16% (tratados)	(219)
Honduras	2002-2003	Naïve	336		9,2%	7,7%, 7,1% y 2,7%	(278)
Honduras	2004-2007	Naïve nuevo diagnóstico	200		7%	3%, 5% y 0,5%	(317)
Honduras	2004-2007	Fracaso terapéutico	138	81%			(316)
Honduras	1989-2009 (año de nacimiento)	Niños, 48 tratados y 6 naïve	54	74,4%	16,6%	44%, 66,7% y 16% (tratados)	(219)
Honduras	2001-2004 (año de nacimiento)	Niños naïve	55		13%	28,5%, 43% y 28,5%	(341)
Panamá	2008-2010	47 adultos y 25 niños, todos naïve	72		12,7% adultos 12% niños	10,6% ITIAN e ITINN y 2,1% IP (adultos) 12% ITIAN e ITINN (niños)	(102)
Colombia		77 tratados con fracaso virológico y 103 naïve	180	85,7%	5,8%		(141)
Venezuela		Tratados y naïve	100	26%	3%		(131)
Venezuela		Naïve asintomáticos	20		10%		(78)
Venezuela		Naïve diagnóstico reciente	62		6,4%		(103)



## Diversidad genética del VIH-1 en Panamá

<b>Perú</b>	2002	16 tratados y 359 <i>naive</i>	375	31,3%	3,3%		(264)
<b>Perú</b>	2008-2010	Tratados con fracaso virológico	267	81,5%			(516)
<b>Chile</b>	2000-2005	66 tratados y 79 <i>naive</i>	136	77%	2,5%	61%, 84% y 46% (tratados)	(391)
<b>Argentina</b>	2006-2008	Nuevo diagnóstico	214		8,4%		(340)
<b>Argentina</b>		<i>Naive</i> de nuevo diagnóstico	52		7,7%		(356)
<b>Brasil</b>		Nuevo diagnóstico	113		13,9%	5,9%, 4,9% y 5,9%	(407)
<b>Brasil</b>	2008-2009	Nuevo diagnóstico	82		11%	5%, 3,6% y 2,4%	(193)
<b>Brasil</b>		Pacientes tratados	57	24,6%		24,6%, 21% y 7%	(414)
<b>Cuba</b>	2003	175 tratados y 250 <i>naive</i>	425			52,2% ITIAN e ITINN y 30% IP (tratados) 6,4% ITIAN e ITINN y 3,2% IP ( <i>naive</i> )	(352)
<b>Cuba</b>	2004-2009	5 niños tratados y 6 <i>naive</i>	11	80%	33,3%		(354)
<b>Cuba</b>	2009-2011	Nuevo diagnóstico	200		21,5%		(281)
<b>Cuba</b>	2003, 2009-2011	Fracaso terapéutico	383			69,5%, 54,8% y 44,4%	(259)
<b>Jamaica</b>		Tratados y <i>naive</i>		35%	29%		(206)
<b>República Dominicana</b>		Pacientes crónicos <i>naive</i>	103		7,8%		(320)

<sup>a</sup>Pacientes tratados: individuos VIH positivos previamente tratados con fármacos ARV.

<sup>b</sup>Pacientes *naive*: individuos VIH positivos sin exposición previa a fármacos ARV.

### 1.12. EPIDEMIOLOGÍA MUNDIAL DE VIH-1

El informe mundial anual de 2011 del Programa Conjunto de Naciones Unidas sobre VIH/SIDA (ONUSIDA) (18) señala que el número de nuevas infecciones sigue descendiendo globalmente, aunque algunas epidemias locales continúan extendiéndose en diversas partes del mundo. Además, informa del descenso del número de niños que mueren por causas relacionadas con el SIDA o que se infectan por VIH.

Según estimaciones de ONUSIDA (18), en 2011 34 millones de personas estaban infectadas por VIH-1, correspondiendo al 0,8% de la población adulta entre 15 y 49 años de edad, y en ese año 2,5 millones de personas se infectaron con VIH y 1,7 millones fallecieron por causas relacionadas con el SIDA. África subsahariana sigue siendo la región más afectada, con 23,5 millones de casos, seguida del sur y sudeste de Asia con 4,2 millones (Figura 17). En África subsahariana 1,8 millones de personas se infectaron por el VIH en 2011, 25% menos que en 2001; sin embargo el 71% de las nuevas infecciones de todo el mundo se produjeron en esta región. Entre los países del África subsahariana, las mayores prevalencias corresponden al sur y el este del continente, con países como Sudáfrica, Botswana, Lesotho o Swazilandia que presentan prevalencias mayores del 15% entre la población adulta, aunque también se dan prevalencias  $\geq 5\%$  en países de África central (Camerún, República Centroafricana, Gabón, y Guinea Ecuatorial) y del África oriental (Tanzania, Uganda y Kenia) (Figura 18). Fuera de África, encontramos prevalencias  $\geq 1\%$  en algunos países de la antigua Unión Soviética (Rusia, Ucrania y Estonia), Tailandia, Belice, Guyana, Surinam y varios países del Caribe.

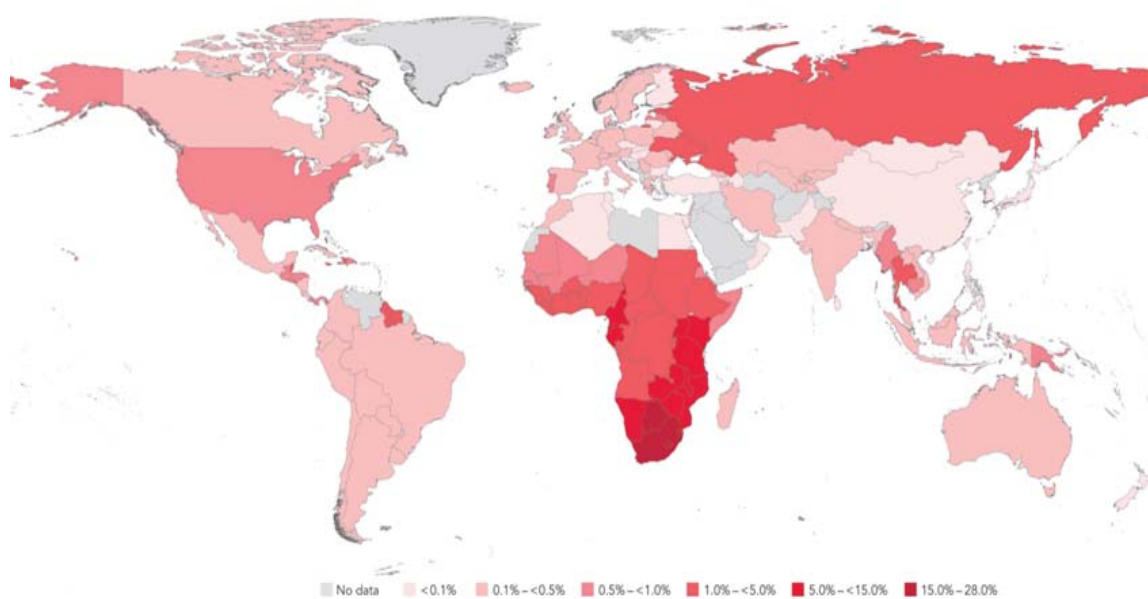
En Norteamérica, 1,4 millones de personas viven infectadas por VIH, 58.000 se infectaron en 2011, 0,6% es la prevalencia de infección por VIH en adultos y 20.000 es el número de personas que fallecieron por causas relacionadas con el SIDA. América Latina tiene 1,4 millones de personas viviendo con VIH, mientras 83.000 personas se infectaron en 2011, 0,4% es la prevalencia de infección por VIH en adultos y 54.000 es el número de personas que fallecieron por causas relacionadas con el SIDA. En el Caribe la prevalencia de infección

por VIH en adultos es de 1%, mayor que en cualquier región fuera del África subsahariana, aunque el número de personas que vive con VIH es relativamente bajo, de 230.000. En 2011, 13.000 personas se infectaron por VIH y 10.000 fallecieron por causas relacionadas con el SIDA.

Entre los países de América Latina, las mayores prevalencias de infección por VIH corresponden a Belice en Centroamérica y Guyana y Surinam en Sudamérica que presentan prevalencias  $\geq 1\%$  entre la población adulta, mientras que se dan prevalencias  $\geq 1,5\%$  en algunos países del Caribe (Bahamas, Haití, Jamaica y Trinidad y Tobago) (Tabla 5).



**Figura 17.** Número de personas que viven con VIH-1 en diferentes áreas geográficas del mundo en 2011, según estimaciones de ONUSIDA (18).



**Figura 18.** Prevalencia por países de infección por VIH-1 en la población adulta en 2009 (28).

**Tabla 5.** Prevalencia de infección por VIH-1 en adultos en América Latina y el Caribe, según estimaciones de ONUSIDA (17, 18).

Región	País	Estimado (%)
<b>Norteamérica</b>	México	0,2
<b>Centroamérica</b>	Belice	2,3
	Guatemala	0,8
	El Salvador	0,6
	Honduras	0,7
	Nicaragua	0,2
	Costa Rica	0,3
	Panamá	0,8
<b>Sudamérica</b>	Colombia	0,5
	Venezuela	0,5
	Guyana	1,1
	Surinam	1,0
	Brasil	0,3
	Ecuador	0,4
	Perú	0,4
	Bolivia	0,3
	Paraguay	0,3
	Chile	0,5
	Argentina	0,4
	Uruguay	0,6
<b>El Caribe</b>	Bahamas	2,8
	Barbados	0,9
	Cuba	0,2
	República Dominicana	0,7
	Haití	1,8
	Jamaica	1,8
	Trinidad y Tobago	1,5

Considerando la prevalencia de infección por VIH-1 por cada 1.000 habitantes, los países de Latinoamérica se han dividido en tres grupos: **1)** países con prevalencia baja (entre 0,5 y 2,4/1.000 habitantes): Chile, Costa Rica, México, Paraguay, Bolivia, Nicaragua y Cuba; **2)** países con prevalencia media (entre 2,5 y 4,4/1.000 habitantes): Guatemala, Brasil, Colombia, Uruguay, Argentina, Ecuador y Perú; y **3)** países con prevalencia alta (entre 4,5 y 6,4/1.000 habitantes): República Dominicana, Panamá, El Salvador y Honduras (463). En relación con el sexo y la edad, México (73,2%), Costa Rica (69,4%) y Panamá (68,5%) son los países de Latinoamérica con mayor porcentaje de varones adultos infectados por VIH, mientras República Dominicana (56,1%), Argentina (32,7%) y El Salvador (32,4%) tienen el mayor porcentaje de mujeres adultas (463); y Bolivia (8,3%), Paraguay (7,7%) y Colombia (6,3%) tienen el mayor porcentaje de casos infantiles (463).

El principal modo de transmisión del VIH en el continente americano son las relaciones sexuales no protegidas, especialmente a través de comercio sexual, aunque los UDIs también tienen un rol importante en algunos pocos países pero menos relevante comparado con otras áreas geográficas del mundo. El Caribe es, después del África subsahariana, la región con la segunda mayor proporción de mujeres en la población infectada por VIH (53%) (28). Las prevalencias más altas de infección se dan en mujeres trabajadoras del sexo: 4% en República Dominicana (3, 24), 9% en Jamaica (16), y 27% en Guyana (22). En el grupo de HSH la epidemia está subestimada debido al estigma y la discriminación. Hacen falta más estudios para determinar el escenario real de la epidemia en esta población, aunque existen datos que indican que va en aumento en países como Jamaica (169), Cuba (123), y la República Dominicana (202). En Bermudas y Puerto Rico la población de UDIs es importante en la diseminación de la infección. En Puerto Rico, por ejemplo, este grupo es responsable del 40% de las nuevas infecciones en hombres y del 27% en mujeres (29).

En el continente americano la epidemia se concentra en grupos de riesgo, como HSH, trabajadoras del sexo, UDIs y personas reclusas en prisiones. En un estudio realizado en HSH se encontró una prevalencia del 10% en 12

países de 14 participantes (59), incluyendo Costa Rica (4). En cinco países de Centroamérica la incidencia anual de infección por VIH fue mayor de 5,1% entre HSH (437), mientras que en Lima (Perú) se encontró una incidencia del 3,5% entre HSH atendidos en clínicas de salud pública (409). Ambos porcentajes son mucho mayores que los descritos en Europa y Norteamérica. En Latinoamérica, al igual que en el Caribe, el estigma y la discriminación social contribuyen a la subestimación de la epidemia en el grupo de HSH. En Centroamérica y países como Argentina, existen pocos programas de prevención de la infección en este grupo de población (23). Además, en Centroamérica uno de cada cinco HSH aseguró haber tenido relaciones sexuales con mujeres en los 6 meses anteriores (437). En Estados Unidos y Canadá los datos epidemiológicos indican un incremento de nuevas infecciones en el grupo HSH y un descenso en UDIs (25, 205).

Según datos de ONUSIDA (18), en Latinoamérica se está registrando un aumento de los casos de VIH en homosexuales, evidenciando un incremento de las conductas de riesgo en esta población. Además, debido al estigma y la discriminación, una alta proporción de HSH mantiene relaciones sexuales con mujeres, fomentando la transmisión del VIH por vía heterosexual y formándose un puente de transmisión del virus entre estos grupos (18, 463). Se estima que en Latinoamérica la prevalencia de relaciones heterosexuales en homosexuales es de ~ 30% (463). Los países en los que las vías hetero y homosexual están más igualadas son México, Panamá y, en menor medida, Perú (463). Por otra parte, existe un elevado porcentaje de casos de VIH de los cuales no se conoce la vía de transmisión, siendo los países con los porcentajes más altos México, Panamá y Colombia (18, 463). Estos altos porcentajes indican la necesidad de mejorar la vigilancia epidemiológica del VIH/SIDA en Latinoamérica.

En algunos países la epidemia de VIH esta desproporcionalmente concentrada en ciertos grupos raciales o étnicos. Por ejemplo, en Estados Unidos en el año 2006 el 45% de los nuevos diagnósticos correspondieron a mujeres afro-americanas, aunque sólo representan el 12% de la población (205). Los hombres afro-americanos tienen 6,5 veces y las mujeres afro-americanas 19

veces más probabilidad de adquirir la infección por VIH que sus contrapartes caucásicas (204). Por otra parte, en Canadá en 2008 los grupos aborígenes comprendieron el 8% de las personas que viven con VIH y el 13% de los nuevos diagnósticos, aunque sólo representan el 3,8% de la población (25).

En la frontera entre México y Estados Unidos, las redes de UDIs y de trabajadoras del sexo son los principales responsables de diseminar el VIH. En un estudio realizado en 2008 en Ciudad Juárez y Tijuana (México) se encontró una prevalencia del 12% entre mujeres trabajadoras de sexo que también son UDIs y del 3% en el conjunto de UDIs (342, 442), mientras que en un estudio del año 2006 en Tijuana en mujeres embarazadas la prevalencia de VIH fue de 1% y de 6% en embarazadas que también son UDIs (83).

En el grupo de trabajadoras de sexo, la mayoría de los países de la región está promoviendo la prevención de la transmisión del VIH. Por ejemplo, se ha descrito baja prevalencia de la infección en mujeres trabajadoras del sexo asociado a una alta frecuencia de utilización del condón en Santiago (Chile) (62), El Salvador (5) y Guatemala (402). Los UDIs son también un grupo importante de transmisión en algunos países, especialmente en el cono sur de Sudamérica. Se estima que casi dos millones de personas en esta región son UDIs y más de una cuarta parte de ellos podrían estar infectados por VIH.

En Latinoamérica, la población carcelaria es otro grupo importante con altos índices de prevalencia de infección por VIH. Por ejemplo, en una prisión de Sao Paulo (Brasil), aproximadamente el 6% de los varones reclusos en prisiones estaban infectados por VIH (108). Debido a esta evidencia, algunos países de la región han comenzado a implementar programas de prevención de infección por VIH en las cárceles.

En los países de Sudamérica con las epidemias más antiguas, la transmisión heterosexual está aumentando. En Perú por ejemplo, el 43% de las nuevas infecciones se atribuyen a transmisión sexual, la mayor parte por contacto heterosexual (42).

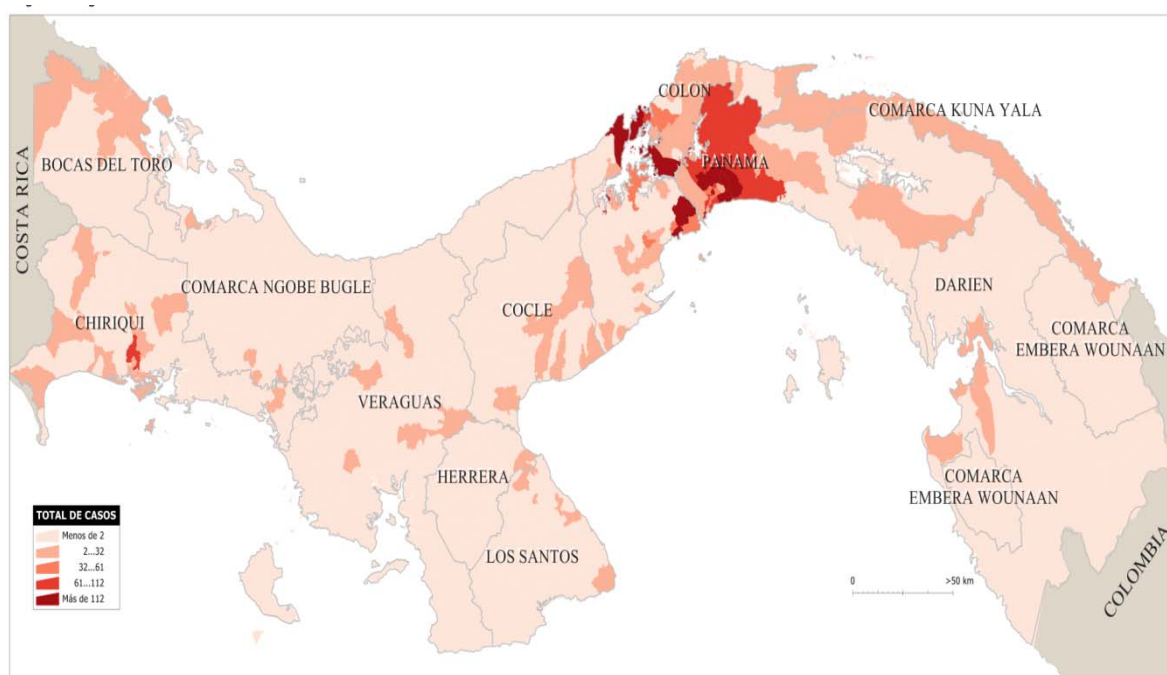


### 1.13. SITUACIÓN ACTUAL DE LA EPIDEMIA DE VIH/SIDA EN PANAMÁ

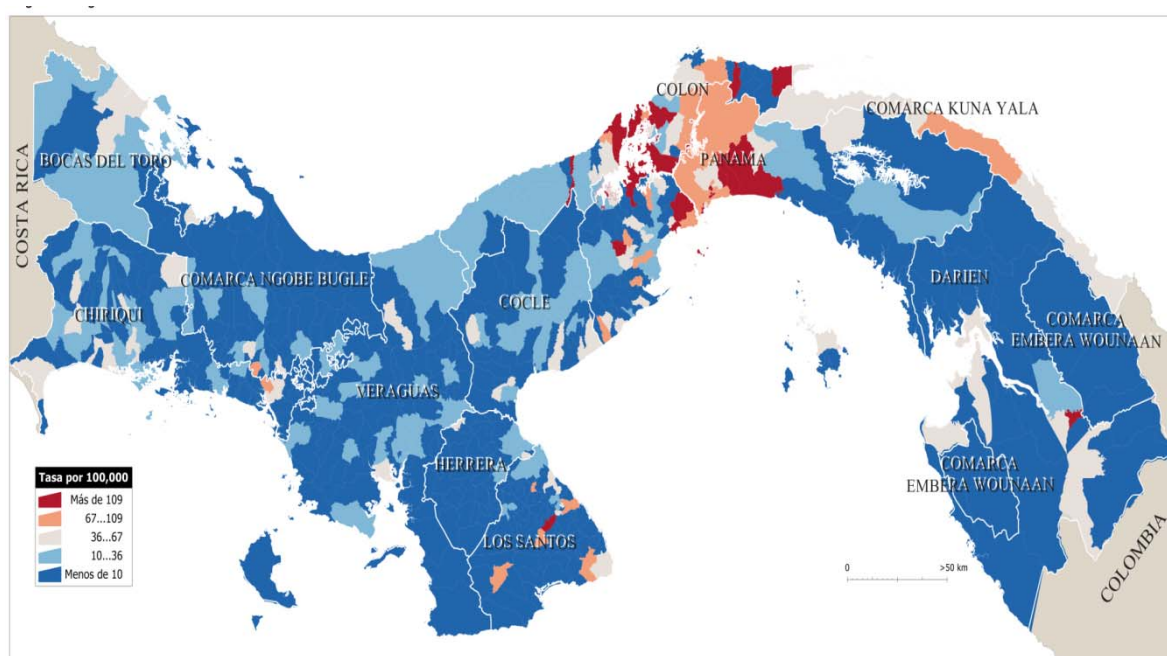
Panamá tiene una prevalencia de infección por VIH de 0,8% ocupando junto a Guatemala el segundo lugar en Centroamérica después de Belice con 2,3% (18).

Desde septiembre de 1984 (cuando se detectó el primer caso de SIDA) hasta diciembre de 2010, se han notificado 6.261 casos acumulados de infección por VIH sin manifestaciones clínicas de SIDA, (3.691 hombres y 2.570 mujeres), con una relación de 1,4 hombres por cada mujer infectada (9, 11). Hasta septiembre de 2012 se han notificado 12.442 casos acumulados de SIDA (9.282 hombres y 3.160 mujeres) (Figura 19), de los cuales 8.292 (incluyendo niños y adultos) corresponden a defunciones, registrándose una tasa de letalidad acumulada del 67% (Figura 20) (10, 11). Por lo tanto, en la República de Panamá en el año 2012 podría haber aproximadamente 10.000 personas viviendo con VIH/SIDA (10).

El grupo de edad más afectado es el de 25-44 años, que corresponde a la población en edad reproductiva y económicamente activa. Las principales vías de transmisión son el contacto sexual (66,8%), seguido de la transmisión perinatal (2,8%), y la transmisión sanguínea (1,2%). En el 29,2% de los casos restantes se desconoce la ruta de transmisión. Entre las infecciones transmitidas sexualmente, 50,7% corresponden a transmisión heterosexual, 12,4% a transmisión homosexual y 3,8% a hombres bisexuales, desconociéndose en el 33,1% de los casos restantes el tipo de transmisión sexual. La transmisión vertical representa el 3% del total de casos notificados. Para el año 2011, se estimó una prevalencia de infección por VIH del 1,92% en trabajadoras del sexo y del 22,8% en HSH (10, 11).



**Figura 19.** Casos acumulados de SIDA desde el año 2001 al 2008 en la República de Panamá (2).



**Figura 20.** Casos acumulados de mortalidad por SIDA desde el año 2001 al 2008 en la República de Panamá (1).

Panamá se caracteriza por tener una epidemia concentrada especialmente en las áreas urbanas (Panamá Centro, Colón, San Miguelito y Panamá Oeste, además de las Comarcas de Guna Yala y Ngabe Buglé), pero con tendencia a la expansión en áreas rurales, afectando a grupos específicos como trabajadoras/es del sexo, HSH, población transgénero y heterosexuales de alto riesgo. Es probable que en todas las áreas de salud del país haya un subregistro de infecciones por VIH, particularmente en las zonas indígenas, a pesar de que la infección por VIH es de notificación obligatoria. Actualmente, la infección por VIH/SIDA representa la séptima causa de muerte en el país (11).

En 1999 la Caja del Seguro Social de Panamá inició el tratamiento con fármacos ARV para los pacientes asegurados y en el 2002 el Ministerio de Salud amplió la cobertura al resto de pacientes infectados por VIH. Hasta diciembre de 2011, 3.659 personas (incluyendo niños y adultos) están recibiendo terapia ARV, y desde su aplicación se ha logrado una disminución en la mortalidad por SIDA (11).

Los datos de epidemiología molecular de VIH/SIDA en Panamá son limitados. Actualmente, los más recientes estudios publicados provienen de trabajos realizados en la Unidad de Biología y Variabilidad de VIH y en la Unidad de Virología Molecular, del Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III de Majadahonda (Madrid) (40, 41). Los datos obtenidos en esta tesis doctoral son inéditos y representan el primer estudio de epidemiología molecular de VIH en Panamá, que permitirá analizar la diversidad genética del virus, incluyendo distribución de los subtipos circulantes, caracterización de genomas virales completos, análisis de recombinación y relaciones filogenéticas con virus de otros países, así como la prevalencia de mutaciones de resistencia asociadas a fármacos ARV. Estos estudios permitirán obtener un mejor conocimiento de la epidemiología de VIH-1 en Panamá, lo cual contribuirá también a un mejor conocimiento de la propagación del virus en la región centroamericana. Los datos de epidemiología molecular de esta tesis junto con los estudios previos de distribución de las formas genéticas de VIH-1 realizados en los últimos años en países de Centroamérica, el Caribe y países vecinos de Sudamérica como Colombia y Venezuela, en los que circula el

subtipo B, con casos esporádicos de otras formas genéticas (excepto en Cuba, donde predominan en conjunto las formas genéticas no B) (Tabla 6), permitirán obtener información sobre la dinámica de propagación del VIH-1 en la población de esta área geográfica, y estos datos servirán como guía de actuación en salud pública frente a la epidemia de VIH/SIDA.

**Tabla 6.** Distribución de las formas genéticas del VIH-1 en México, Centroamérica, Colombia, Venezuela y el Caribe.

País	Año de recolección	Población	n	Segmento analizado	Subtipos/ Recombinantes	Referencia
México	1998-1999	Hombres	65	C2-V5	65 B	(394)
México	2002-2008	<i>Naïve</i> y tratados	223	PR-RT	220 B, 2 BG y 1 BF	(497)
México	2005-2010	<i>Naïve</i>	1655	PR-RT	1653 B, 1 12_BF y 1 06_cpx	(51)
Belice	2001-2004 (año de nacimiento)	Niños <i>naïve</i>	11	PR-RT	9 B y 2 C	(341)
Guatemala	2010-2011	<i>Naïve</i>	145	PR-RT	140 B, 4 BF y 1 C	(52)
El Salvador	1989-2009 (año de nacimiento)	Niños, 15 tratados y 11 <i>naïve</i>	26	PR-RT	26 B	(219)
Honduras	1994		12	V3	12 B	(265)
Honduras		Clínicas de ETS	27	V3	27 B	(88)
Honduras	1996-1998	FSW, Mujeres, HSH	54	gp120 (n=17), V3 (n=41) y LTR (n=15)	54 B	(379)
Honduras	2002-2003	<i>Naïve</i> reclutados para tratamiento ARV	336	PR-RT	333 B, 1 F1, 1 AD y 1 C	(278)
Honduras	2004-2007	<i>Naïve</i> nuevo diagnóstico	200	PR-RT	198 B, 1 AD y 1 AK	(317)
Honduras	2004-2007	Fracaso terapéutico	138	PR-RT	138 B	(316)
Honduras	2001-2004 (año de nacimiento)	Niños <i>naïve</i>	55	PR-RT	55 B	(341)
Honduras	1989-2009 (año de nacimiento)	Niños, 48 tratados y 6 <i>naïve</i>	54	PR-RT	54 B	(219)
Honduras	2004-2007	Tratados	76	PR-RT	76 B	(138)

## Diversidad genética del VIH-1 en Panamá

<b>Costa Rica</b>	1997-2004	Basales 36 y fracaso terapéutico 77	113	PR-RT y V3	111 B, 1 BF y 1 BG	(457)
<b>Colombia</b>			237	<i>env</i>	237 B	(310)
<b>Colombia</b>	2001-2002		115	V3 (HMA) y PR-RT (n=24)	115 B	(408)
<b>Colombia</b>	2002	HSB	113	V3 (HMA) y PR-RT (n=10)	112 B y 1 BF	(167)
<b>Colombia</b>			35	V3	35 B	(503)
<b>Venezuela</b>			100	PR-RT	99 B y 1 BF	(131)
<b>Venezuela</b>			72	V3	71 B y 1 F	(104)
<b>Venezuela</b>			106	V3 y <i>gag</i>	194 B, 1 C y 1 BC	(105)
<b>Venezuela</b>			30	PR-RT y <i>env</i>	30 B	(142)
<b>Venezuela</b>		<i>Naive</i> asintomáticos	20	<i>env</i> y <i>gag</i> , HMA y PR-RT	20 B	(78)
<b>Venezuela</b>		<i>Naive</i> diagnóstico reciente	62	PR-RT	57 B, 2 BF, 2 06_cpx y 1 01_AE	(103)
<b>Venezuela</b>	2003-2008		423	<i>pol</i> , <i>env</i> , <i>vif</i> y <i>nef</i>	421 B, 1 C y 1 AG	(378)
<b>Bahamas</b>	2005	Embarazadas	13	PR-RT	13 B	(190)
<b>Trinidad y Tobago</b>	1987-1997	Seroconvertidores	31	<i>env</i>	31 B	(107)
<b>Trinidad y Tobago</b>			31	PR-RT	31 B	(496)
<b>Trinidad y Tobago</b>			30	PR-RT	30 B	(321)
<b>Antigua</b>			8	PR-RT	8 B	(496)
<b>Dominica</b>			5	PR-RT	5 B	(496)
<b>Granada</b>			4	PR-RT	4 B	(496)
<b>St. Lucia</b>			5	PR-RT	4 B y 1 C	(496)
<b>St. Vincent</b>			6	PR-RT	6 B	(496)
<b>República Dominicana</b>			18	PR-RT	17 B y 1 BC	(321)

## Diversidad genética del VIH-1 en Panamá

<b>Haití</b>			16	PR-RT	16 B	(321)
<b>Barbados</b>	1996		36	PR, RT y V3	36 B	(189)
<b>Jamaica</b>			134	<i>env</i>	131 B, 1 C, 1 D y 1 E	(213)
<b>Jamaica</b>			54	<i>env</i>	50 B, 2 D, 1 A y 1 J	(214)
<b>Jamaica</b>			3	PR-RT	3 B	(321)
<b>Jamaica</b>			7	Genoma completo	7 B	(400)
<b>Cuba</b>	2003, 2009-2011	Fracaso terapéutico	383	PR-RT	39% B, 18% 19_cpx, 14% BG, 10% C, 7% 18_cpx y 4% G	(259)
<b>Cuba</b>	2009-2011	Nuevo diagnóstico	200	PR-RT	36,5% B, 63,5% no B (19_cpx, 20_BG, 23_BG y 18_cpx)	(281)
<b>Cuba</b>	2009; 2010	Nuevo diagnóstico	142	PR-RT	33,1% B, 27,5% 19_cpx, 15,5% BG, 15,5% 18_cpx, 5,6% 18_cpx/19_cpx y 5,6% G	(280)
<b>Cuba</b>	2004-2009	5 niños tratados y 6 <i>naive</i>	11	PR-RT	5 19_cpx, 3 B, 2 18_cpx y 1 C	(354)

*Naive*: individuo VIH positivo sin exposición previa a fármacos ARV.

ETS: enfermedades de transmisión sexual.

FSW: *female sexual worker*, mujeres trabajadoras del sexo.

#### 1.14. INTRODUCCIÓN A LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS FILOGENÉTICO

La filogenia es la ciencia que estudia el pasado evolutivo. En el caso de la filogenia molecular, estudia la relación evolutiva entre distintos organismos basándose en la comparación de secuencias de ADN o proteínas, lo que permite inferir su historia a partir de genes o segmentos de genes que comparten un ancestro común (57, 440, 510). Las relaciones filogenéticas se representan por medio de árboles filogenéticos, que son gráficos que simbolizan relaciones evolutivas de ancestro-descendiente entre secuencias de genes u organismos (57, 218, 510). Los análisis filogenéticos también se han aplicado al estudio del VIH, permitiendo establecer su origen, clasificación y la relación evolutiva entre los distintos virus (228).

La filogenia se basa en el estudio de caracteres homólogos (semejanza heredada a partir de un ancestro común) (57). Para realizar un buen análisis filogenético es necesario que las secuencias de interés estén correctamente alineadas, de manera que los nucleótidos homólogos queden posicionados en la misma columna (203), para lo cual existen diversos programas bioinformáticos que realizan alineamientos múltiples de secuencias (266). Estos métodos se basan en el alineamiento progresivo de secuencias, mediante el cual construyen el alineamiento paso a paso, comenzando con las secuencias más similares y continuando con las más divergentes. El proceso comienza con la construcción de un árbol guía, que determina el orden en que las secuencias serán incorporadas para construir el alineamiento (57). Es recomendable revisar el alineamiento de forma manual con programas de edición de secuencias, tales como Bioedit (26). A menudo, es necesario introducir espacios (*gaps*) en el alineamiento para obtener homología en la posición donde las secuencias tienen diferente longitud (57, 218). Además, es considerado como regla general que cuando haya regiones en la secuencia de difícil alineamiento se eliminen, porque la fiabilidad de la filogenia molecular se basa en el alineamiento correcto de las secuencias. También es recomendable utilizar ADN en secuencias filogenéticamente más próximas y aminoácidos para secuencias más distantes para obtener mayor información (57).



Existen diversos métodos para construir árboles filogenéticos y se pueden clasificar en dos categorías: **1)** métodos basados en matrices de distancias, también denominados métodos algorítmicos o de agrupamiento, y **2)** métodos basados en caracteres, también denominados métodos discretos o de búsqueda (57, 203). El primer paso en los métodos basados en distancias es convertir las secuencias de ADN o proteínas en una matriz de distancias, que representa una estimación de la distancia evolutiva entre secuencias (esta distancia evolutiva o genética es el número de cambios que ha ocurrido a lo largo de las ramas entre dos pares de secuencias); posteriormente se estima la relación filogenética entre las secuencias y se construye un árbol basado en estas distancias. El método de unión por vecindad (*neighbor-joining*, NJ) es el método de reconstrucción filogenética basado en distancias más frecuentemente utilizado (13, 57, 218, 510). El árbol se construye por la búsqueda secuencial de pares próximos, que son pares de secuencias conectadas por un nodo interno. Este algoritmo empieza asumiendo un árbol sin nodos internos y posteriormente los va introduciendo uno a uno, calculando cada vez la longitud del árbol resultante. El árbol elegido al final corresponde al que tiene menor longitud de ramas, de acuerdo con un criterio de mínima evolución (13, 218). El método de NJ es rápido y los resultados obtenidos son satisfactorios si la divergencia entre las secuencias es baja. Sin embargo, estos métodos tienen el problema de que las diferencias observadas entre las secuencias no son un reflejo preciso de las distancias evolutivas procedentes de estas, debido a que múltiples sustituciones en el mismo punto enmascaran la verdadera distancia. Además, es difícil estimar las distancias entre secuencias altamente divergentes (218, 510).

Los métodos basados en caracteres examinan cada posición en las secuencias del alineamiento de forma separada e independiente por cada posición, evaluando árboles y examinando todas las topologías teóricamente posibles para un número dado de secuencias, y, de acuerdo a los resultados obtenidos, construyen el árbol que mejor represente las relaciones evolutivas. Los métodos más utilizados para este tipo de análisis son máxima parsimonia (MP), máxima verosimilitud (*maximum likelihood*, ML) y la inferencia bayesiana (57).

En el método de MP la topología del árbol para un número dado de secuencias se puede explicar con el menor número de cambios (mutaciones) en las secuencias. Este algoritmo empieza considerando un árbol con una topología concreta, deduciendo el menor número de cambios necesarios para explicar todos los nodos. Evalúa todas las topologías razonables y elige como mejor árbol el que requiera menor número de cambios (13, 218). La ventaja de este método es que es rápido para analizar cientos de secuencias y robusto si las ramas son cortas (13, 218). La desventaja es que la parsimonia es susceptible al fenómeno de “atracción de ramas largas”, definido como la tendencia en secuencias altamente divergentes (ramas largas) a agrupar juntas en el árbol a pesar de no estar filogenéticamente (cercanamente) relacionadas. Esto se debe a que secuencias que han evolucionado rápidamente tienen numerosas mutaciones únicas con respecto al resto de secuencias en el árbol. Estas secuencias agrupan entre sí debido a la gran cantidad de cambios presentes en ellas, que hace que los nucleótidos presentes en las ramas coincidan debido a una evolución convergente más que a la propia herencia, hasta el punto de que la semejanza de secuencias resultante puede llegar a enmascarar la verdadera señal filogenética (57, 218).

El método de ML busca el árbol que maximiza la probabilidad de producir las secuencias observadas, de acuerdo con un modelo especificado de evolución. Para evaluar la probabilidad de las secuencias observadas es necesario considerar todas las posibles secuencias ancestrales no observadas y todas las vías mutacionales que sean compatibles con los datos. El método de ML permite reconstruir con precisión las relaciones entre secuencias que han estado separadas por un largo intervalo de tiempo o que evolucionan con rapidez, ya que corrige para las múltiples mutaciones que se producen en la misma posición. La mayor desventaja del método de ML es la gran carga computacional que conlleva, ya que idealmente deben evaluarse todas las topologías posibles de los árboles y cuando el número de secuencias es grande el número de topologías posibles es enorme. Con el fin de hacer la computación más manejable, se utilizan búsquedas heurísticas, aunque éstas no garantizan encontrar el árbol óptimo. Utilizando programas desarrollados en

los últimos años, la estimación de ML puede ser práctica para varios cientos de secuencias (203, 218).

El método de inferencia bayesiana trata de determinar la probabilidad posterior de los árboles dada una probabilidad previa o a *priori*, una función de verosimilitud y ciertos datos, para lo que se utiliza el teorema de Bayes. Debido a que obtener las probabilidades posteriores para este tipo de datos es intratable matemáticamente, se utilizan procedimientos estocásticos para aproximar las probabilidades posteriores, como por ejemplo las cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC por sus siglas en inglés) (218, 227, 396). Los resultados son fáciles de interpretar: la probabilidad posterior de un clado es simplemente la probabilidad de que el clado sea correcto, dados los datos y el modelo. Las desventajas del método bayesiano son, al igual que la ML, los largos tiempos de computación que puede requerir para un gran número de secuencias, la dificultad de especificar los parámetros a *priori* y de determinar hasta cuándo debe ejecutarse la MCMC y la posibilidad de que ocasionalmente infiera altas probabilidades posteriores para clados incorrectos.

#### **1.14.1. Modelos de sustitución de nucleótidos**

La forma más sencilla de calcular la divergencia genética entre dos secuencias es contar el número de sitios en los que difieren. Esta proporción de sitios no homólogos se denomina distancia observada y se expresa como el número de nucleótidos diferentes por sitio (57, 218). El defecto que presenta esta medida es que si la tasa de sustitución es alta, seguramente se subestimen el número de sustituciones que realmente están ocurriendo, por lo que para calcular esta distancia se utilizan métodos estadísticos.

Las sustituciones de nucleótidos pueden ser de dos tipos: transiciones (Ts), una mutación entre dos purinas ( $A \leftrightarrow G$ ) o dos pirimidinas ( $T \leftrightarrow C$ ), y transversiones (Tv), una mutación entre una purina y una pirimidina ( $A \leftrightarrow C$ ,  $A \leftrightarrow T$ ,  $G \leftrightarrow C$ ,  $G \leftrightarrow T$ ) (218, 510).

El ritmo de sustitución de nucleótidos puede variar sustancialmente en diferentes posiciones de la secuencia. Por ejemplo, en la tercera base del

codón se fijan las mutaciones mucho más rápido que en la primera base, y en ésta más que en la segunda; esto se explica por la presencia de diferentes fuerzas que actúan en cada sitio en cuestión y se puede describir como heterogeneidad en los ritmos de evolución entre posiciones, que puede jugar un papel importante en el cálculo de las distancias genéticas.

Existen diversos modelos de sustitución de nucleótidos que se utilizan dependiendo de los parámetros que se estimen. El más sencillo es el de Jukes-Cantor (JC), que estima la misma probabilidad para todas las sustituciones de nucleótidos. Otros modelos más complejos asignan distintos valores a diferentes sustituciones y algunos también tienen en cuenta la frecuencia de nucleótidos y la heterogeneidad de ritmos de evolución entre posiciones. Un modelo comúnmente utilizado es el modelo de dos parámetros de Kimura, que divide las sustituciones en dos categorías, transiciones y transversiones, asignándoles valores distintos, pero asumiendo iguales frecuencias de nucleótidos. Otro modelo utilizado con frecuencia es el Hasegawa-Kishino-Yano (HKY), que asume diferentes ritmos de transiciones y transversiones y frecuencias de nucleótidos variable. El modelo más complejo con una matriz de sustitución simétrica (que asume igual probabilidad de cambio entre dos nucleótidos en ambos sentidos) y por lo tanto reversible en el tiempo, es el *general time reversible* (GTR), en el que las 6 posibles sustituciones entre cada par de nucleótidos tienen un ritmo diferente y los nucleótidos pueden ocurrir con frecuencias diferentes.

#### **1.14.2. Estructura de un árbol filogenético**

El árbol filogenético es sólo una estimación de la historia de un conjunto de secuencias u organismos (203). La estructura de un árbol filogenético se compone de ramas, nodos y raíz. Las ramas conectan los nodos y un nodo es el punto desde el cual dos o más ramas divergen. Las ramas y nodos pueden ser internos o externos (terminales). Los nodos externos, también denominados hojas o unidades taxonómicas operacionales (OTUs), corresponden a las secuencias a partir de la cual deriva el árbol y los nodos internos corresponden a hipotéticos ancestros comunes de OTUs (57, 440). Un conjunto de secuencias que divergen de un sólo nodo forma lo que se denomina clado o

también grupo o *cluster* filogenético, indicando un origen monofilético, lo cual significa que todas las secuencias de este grupo se originaron a partir de un ancestro común (57, 203). Por el contrario, si un grupo excluye alguno de sus descendientes se denomina grupo parafilético (57).

Cada rama en un árbol corresponde a una secuencia genética. El orden o patrón de ramificación nos da la topología del árbol filogenético y la longitud de las ramas representa la distancia genética, lo que permite analizar la evolución a lo largo del árbol, de tal forma que a mayor longitud de las ramas, mayor divergencia y evolución de la secuencia analizada (57). Sin embargo, esto dependerá del árbol que se utilice, porque los *cladogramas* son un tipo de árboles en los que todas las ramas tienen la misma longitud, por lo que no proporcionan una estimación cuantitativa de la divergencia evolutiva, mostrando únicamente las relaciones ancestro-descendiente entre las secuencias analizadas (57).

El árbol filogenético puede construirse no enraizado o enraizado. El árbol no enraizado no proporciona información acerca del orden de la descendencia a partir de un ancestro común, sólo representa la información de un grupo de secuencias sin indicar la dirección en la que se ha generado la diversidad y la evolución a lo largo del tiempo. Un árbol no enraizado no indica cuál de los nodos es el ancestro común (203). Por el contrario, en el árbol enraizado el análisis de los caracteres se basa en un ancestro común. Para su construcción se utilizan una o varias secuencias denominadas grupo externo (*outgroup*) que tiene una relación más lejana con el resto de las secuencias que éstas entre sí, las cuales constituyen el grupo interno (*ingroup*) (203). El nodo de la raíz une el *outgroup* con el *ingroup*, representando el ancestro común del mismo. Este tipo de árbol proporciona información de la dirección en la que la evolución ha ido actuando (57).

La reproducibilidad o estabilidad de la topología de los árboles filogenéticos generados debe analizarse mediante métodos estadísticos. El más utilizado se denomina *bootstrapping* no paramétrico, que asigna un valor (valor de *bootstrap*) a cada nodo, expresado en forma de porcentaje. El método se basa

en un re-muestreo numérico, en el que se obtiene un nuevo alineamiento de secuencias (*pseudorréplicas*) a partir del alineamiento original, mediante muestreo aleatorio con sustitución. Se van tomando columnas de nucleótidos elegidas al azar de la secuencia original y se van colocando en un nuevo alineamiento, hasta que el nuevo alineamiento es del mismo tamaño que el original. Debido a lo aleatorio de la selección, cada columna puede ser elegida dos o más veces o no ser elegida ninguna. El proceso de crear nuevas pseudorréplicas se repite muchas veces (generalmente de 100 a 1.000), obteniéndose nuevos árboles a partir de cada una de ellas. La frecuencia con la que dos o más secuencias divergen a partir de un nodo en los nuevos árboles (denominado valor de *bootstrap*) se utiliza para evaluar la fiabilidad o estabilidad de las relaciones evolutivas mostradas en el árbol. Por regla general se considera que un valor de *bootstrap*  $\geq 70\%$  representa una probabilidad  $\geq 95\%$  de que la relación filogenética entre las secuencias sea real (57, 203, 216, 218, 510).

#### **1.14.3. Métodos para detectar y caracterizar recombinación genética**

Como consecuencia del efecto de la recombinación pueden emerger virus genéticamente distintos, variantes resistentes o virus con tropismo alterado. Por ello, es importante detectar y estimar la ocurrencia de recombinación de manera precisa, porque su cuantificación tiene implicaciones potenciales en cuanto al desarrollo de vacunas y resistencia a medicamentos, así como para la comprensión del origen e historia evolutiva del virus (97).

Para la detección de recombinación se han desarrollado programas informáticos que utilizan diversos métodos, que se pueden clasificar en cinco categorías (97): **1)** Métodos de distancia: buscan alteraciones en los patrones de distancia entre secuencias. Son muy eficientes computacionalmente porque no es necesario reconstruir la filogenia de las secuencias; **2)** Métodos filogenéticos: estiman la filogenia utilizando distintas partes del genoma. La recombinación se presentará como discordancia entre las topologías obtenidas. Si no hay recombinación la topología obtenida deberá ser la misma independientemente de la región utilizada para reconstruir la filogenia. Son los

métodos más usados; **3)** Métodos de compatibilidad: contrastan la existencia de incongruencia filogenética pero usando un análisis de sitio a sitio en lugar de por regiones genómicas. Estos métodos no requieren conocer la filogenia de las secuencias en estudio; y **4)** Métodos de distribución de sustituciones: estudian agrupamientos significativos de sustituciones o su ajuste a una distribución estadística esperada. Incluyen los métodos que usan la teoría de coalescencia. Sin embargo, no hay un estimador óptimo de recombinación. Para maximizar las posibilidades de detectar recombinación cuando está presente, evitando al mismo tiempo inferirla cuando no lo está, es aconsejable calcular la cantidad de divergencia y heterogeneidad en la tasas de sustitución de los datos (97).

Los métodos utilizados para detectar recombinación consisten de dos pasos: **1)** detectar cambios en las relaciones de las secuencias, y **2)** estimar estadísticamente el significado de estos cambios. Los cambios en relaciones de las secuencias que son potencialmente indicativos de recombinación pueden medirse determinando el grado de similitud que comparten un par de secuencias. Sin embargo, presentan el inconveniente de que no siempre dos secuencias que son muy próximas entre sí son similares genéticamente. Es mejor determinar el grado de relación utilizando arboles filogenéticos los cuales son ampliamente utilizados en los métodos para detectar recombinación (290). El método de *bootscanning* (406), por ejemplo, construye árboles filogenéticos con *bootstrap* para diferentes partes de un alineamiento. Las relaciones entre las secuencias se expresan en términos de valores de *bootstrap* para los sitios donde agrupen filogenéticamente las secuencias. Este método ha sido ampliamente utilizado para clasificación viral, y están disponibles procedimientos automatizados para algunos microorganismos, como VIH (125, 256).

El método de *bootscanning* implementado en el programa Simplot (277) es ampliamente utilizado para detectar y analizar recombinación genética en VIH. Los resultados de los análisis se presentan mediante una gráfica, en la que el eje de abscisas (x) representa la posición en la secuencia analizada del punto medio de una ventana de longitud predeterminada, que se desplaza a lo largo

de la secuencia, y el eje de ordenadas (y) representa el valor de *bootstrap* con el que la secuencia analizada agrupa en un árbol filogenético con las secuencias de referencia dentro de cada ventana. El gráfico obtenido permite detectar la presencia de recombinación y apreciar la estructura en mosaico del genoma analizado, ya que mediante un código de colores se distinguen los valores de *bootstrap* correspondientes a cada secuencia de referencia, de manera que se puede detectar un punto de recombinación cuando se entrecruzan las líneas correspondientes a distintas referencias, indicando un cambio en las relaciones filogenéticas de la secuencia analizada, siempre y cuando los valores de *bootstrap* sean  $\geq 70\%$ .

#### **1.14.4. Métodos de datación molecular**

Los análisis de secuencias, además de determinar el origen común de las infecciones, permiten obtener otras inferencias epidemiológicas, como el crecimiento del número efectivo de infecciones y la datación del origen de los *clusters*, que pueden utilizarse para conocer la dinámica evolutiva de la epidemia (272, 370). Estos análisis de datación se basan en la divergencia progresiva a lo largo del tiempo de las secuencias virales derivada de los errores de copia de la polimerasa viral. En el caso del VIH-1, se ha observado dicha divergencia progresiva en las poblaciones virales de individuos infectados en cadenas de transmisión conocidas (268) y a escala poblacional durante el transcurso de una epidemia (63, 260). En los últimos años, se han desarrollado sofisticados métodos de datación molecular, entre los que destacan los métodos bayesianos de cadenas de Markov Monte Carlo, los cuales implementan “relojes moleculares relajados”, que permiten diferentes ritmos de evolución en diferentes linajes y secuencias heterocrónicas. La validez de este método de datación ha sido establecida comparando las fechas estimadas con las fechas conocidas de infección (515). Estos métodos analíticos, denominados “filodinámicos” (370), se han aplicado al estudio de la historia epidémica de la infección por VIH-1 en diferentes países (68, 185, 226, 272, 353, 460).



# **OBJETIVOS**

## 2. OBJETIVOS

### Objetivo general

Determinar la diversidad genética del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) en Panamá.

### Objetivos específicos

Utilizando muestras de individuos infectados por VIH-1 residentes en Panamá, incluyendo tanto asintomáticos como pacientes con SIDA:

1. Determinar la prevalencia de subtipos y formas recombinantes de VIH-1, analizando los genes *gag* (p17), *env* (C2-C4) y *pol* (PR-TI).
2. Determinar la prevalencia de mutaciones de resistencia a fármacos antirretrovirales en el gen *pol* (PR-TI).
3. Determinar la presencia de *clusters* filogenéticos intrasubtipo y analizar su correlación con variables epidemiológicas (vía de transmisión y zona de residencia).
4. Caracterización filogenética de genomas completos de las distintas formas genéticas y *clusters* intrasubtipo identificados en segmentos parciales, incluyendo análisis de recombinación inter e intrasubtipo.
5. Determinar la relación filogenética entre los virus de Panamá y los de otros países.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Muestras de pacientes infectados por VIH-1

El número de muestras analizadas fue 163, de los cuales 107 eran de pacientes con SIDA y 56 de individuos seropositivos para VIH-1 asintomáticos, obtenidas de los dos principales hospitales de Panamá, el Complejo Hospitalario Dr. Arnulfo Arias Madrid, de la Caja del Seguro Social de Panamá (CSS), que contribuyó con 91 muestras de pacientes con SIDA y 56 de individuos asintomáticos infectados por el VIH-1, y el Hospital Santo Tomás (HST) que contribuyó con 16 muestras de pacientes con SIDA. Todas las muestras fueron recogidas en 2004 y 2005. Las muestras se obtuvieron tras el consentimiento informado de los pacientes.

De 163 muestras, 131 (80,4%) correspondían a hombres y 32 (19,6%) a mujeres. El rango de edad fue de 19 a 74 años. Con respecto a las rutas de transmisión, todos los pacientes se infectaron mediante contacto sexual. Las conductas de riesgo fueron las siguientes: 86 (52,8%) heterosexuales, 30 (18,4%) homosexuales, 4 (2,4%) bisexuales, y en 43 casos no se especificó el tipo de conducta de riesgo. La distribución de los lugares de residencia era la siguiente: 72 del Distrito de Panamá, 35 del Distrito de San Miguelito, 25 del Distrito de Arraiján, 7 de la Provincia de Colón, 5 del Distrito de La Chorrera, 2 del Distrito de Chepo, 2 del Distrito de Capipe, 2 de la Provincia de Chiriquí, 1 de la Provincia de Coclé, 1 de la Provincia de Veraguas, 1 de la Provincia de Bocas del Toro y 1 de la Comarca Guna Yala. En 9 casos no había información sobre el lugar de residencia. Los datos clínicos y epidemiológicos de los 147 pacientes en los que se pudo secuenciar algún fragmento del genoma se presentan en la Tabla A1 del Apéndice.

Con el objetivo de analizar correlaciones geográficas de los *clusters* filogenéticos, Panamá fue dividido en dos áreas separadas por el Canal de Panamá: 1) Panamá oriental, que comprende los Distritos de Panamá, San Miguelito y Chepo, la Provincia de Colón y la Comarca Guna Yala; y 2) Panamá occidental, que comprende los Distritos de Arraiján, Capipe y La Chorrera, y las Provincias de Coclé, Veraguas, Chiriquí y Bocas del Toro (Figura 21).



**Figura 21.** Mapa de la República de Panamá dividido en dos áreas geográficas separadas por el Canal de Panamá. Las regiones de las que proceden las muestras situadas en Panamá oriental se señalan con una estrella roja y las situadas en Panamá occidental con un círculo rojo.

### 3.2. Separación de plasma y extracción de ARN

Las muestras de sangre fueron centrifugadas para separar el plasma sanguíneo. La extracción del ARN se realizó a partir de 200 µl de plasma con el protocolo de lisis externa utilizando el MagNa Pure LC Automated Nucleic Acid Extraction System (Roche, Mannheim, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante, siendo el volumen de elución final de 50 µl.

### 3.3. Amplificación de segmentos parciales de los genes *gag*, *env* y *pol*

#### 3.3.1. Amplificación del gen *gag* (p17)

La amplificación de *gag* (p17), se realizó mediante una transcripción inversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) (síntesis de ADNc a partir de ARN seguida de PCR), utilizando el One Step RT-PCR Kit (Qiagen). Esta región corresponde a los nucleótidos (nt) 790 a 1236 en el genoma proviral del virus de referencia HXB2. Las condiciones de la

amplificación fueron descritas previamente (98) y las secuencias de los cebadores utilizados se muestran en la Tabla 7.

El perfil térmico para la RT-PCR fue: 30 minutos a 50°C para la retrotranscripción, seguido de 1 ciclo de desnaturalización a 95°C durante 2 minutos; 35 ciclos de: a) desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, b) hibridación a 55°C durante 30 segundos, c) extensión a 72°C durante 1 minuto, y por último, un ciclo de extensión final a 72°C durante 10 minutos.

Los productos amplificados fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en tampón TAE 1x, y teñidos con Sybr® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, Eugene, Oregon, EE.UU.) (que se intercala entre las bases del ADN y produce fluorescencia cuando se estimula con luz UV). Se consideró que un resultado era positivo si el amplicón obtenido tenía el tamaño que le corresponde según su peso molecular comparado con el marcador.

### **3.3.2. Amplificación del gen *env* (C2-C4)**

La amplificación de *env* (C2-C4) se realizó mediante RT-PCR, seguida de una PCR anidada. Esta región corresponde a los nt 7020 a 7601 en el genoma de HXB2. Las condiciones de la amplificación fueron descritas previamente (98) y las secuencias de los cebadores utilizados se muestran en la Tabla 7.

El perfil térmico para la RT-PCR fue idéntico al descrito en el punto 3.3.1.

El perfil térmico para la PCR anidada fue: un ciclo de desnaturalización a 94°C durante 5 minutos; 35 ciclos de: a) desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, b) hibridación a 55°C durante 30 segundos, c) extensión a 72°C durante 1 minuto, y por último, un ciclo de extensión final a 72°C durante 10 minutos.

Los productos amplificados fueron visualizados como se describe en el punto 3.3.1.

### 3.3.3. Amplificación del gen *pol* [proteasa-transcriptasa inversa (PR-TI)]

La amplificación de *pol* (proteasa-transcriptasa inversa) se realizó mediante RT-PCR, seguida de una PCR anidada. El segmento amplificado comprende la proteasa (PR) (297 nt) y 1080 nt de la transcriptasa inversa (TI), correspondientes a los nt 2103 a 3629 en el genoma de HXB2. Las condiciones de la amplificación fueron descritas previamente (502) y las secuencias de los cebadores utilizados se muestran en la Tabla 7.

El perfil térmico para la RT-PCR fue: 30 minutos a 50°C para la retrotranscripción, seguido de 1 ciclo de desnaturalización a 94°C durante 2 minutos; 40 ciclos de: a) desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, b) hibridación a 55°C durante 1 minuto, c) extensión a 72°C durante 90 segundos, y por último, un ciclo de extensión final a 72°C durante 5 minutos.

El perfil térmico para la PCR anidada fue: un ciclo de desnaturalización a 94°C durante 2 minutos; 40 ciclos de: a) desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, b) hibridación a 56°C durante 1 minuto, c) extensión a 72°C durante 1 minuto, y por último, un ciclo de extensión final a 72°C durante 5 minutos.

Los productos amplificados fueron visualizados como se describe en el punto 3.3.1.

### 3.4. Purificación de los productos de PCR

Los fragmentos amplificados mediante PCR fueron purificados mediante una digestión enzimática para eliminar los restos de los cebadores y nucleótidos no incorporados, que podrían afectar a la reacción de secuenciación. La reacción de purificación se realizó con 5 µl del producto de PCR, 1 µl de exonucleasa I (10 U/µl) (degrada los cebadores presentes en solución) y 2 µl de fosfatasa alcalina (2 U/µl) (degrada los restos de dNTPs) (Amersham Laboratories, Arlington Heights, IL, EE.UU.). La reacción se efectuó mediante incubación durante 15 minutos a 37°C, seguida de inactivación de las enzimas a 80° C, durante 15 minutos.

**Tabla 7.** Secuencias de los cebadores utilizados para la amplificación de segmentos parciales de los genes *gag*, *env* y *pol* de VIH-1.

Gen	Reacción	Sense/ Antisense	Nombre	Secuencia	Posición en HXB2
<b><i>gag</i> (p17)</b>	RT-PCR	S	170U	5'-TCTCTAGCAGTGGCGCCC GAACAGGGAC-3'	626-648
		A	174GD	5'-TCTATCCCATTCTGCAGCT TCCTCATTGAT-3'	1402-1431
<b><i>env</i> (C2-C4)</b>	RT-PCR	S	169U	5'-AATGTCAGCACAGTACAAT GTACAC-3'	6945-6967
		A	96ED	5'-GCGTCTAGACAATAATTGT CTGGCCTGTACCGT-3'	7836-7868
	PCR anidada	S	27ECU	5'-ATAAGCTTGCAGTCTAGCA GAAGAAGA-3'	7004-7030
		A	167ED	5'-TTCTCCAATTGTCCCTCAT ATCTCCTCCTCCA-3'	7636-7665
<b><i>pol</i> (PR-TI)</b>	RT-PCR	S	RP1S	5'-GAAAAAGGGCTGTTGGAA ATGTGGAA-3'	2016-2038
		A	RP1A	5'-AAATTTAGGAGTCTTTCCC CATATTACTATGC-3'	685-3716
	PCR anidada	S	PROS-2	5'-GCTAATTTTTTAGGGAAGA TCTGGCCTT-3'	2080-2102
		A	RTOA	5'-TGCCTCTGTTAATTGTTTT ACATCATTAGTGTG-3'	3630-3662



### 3.5. Secuenciación

Los productos de PCR purificados fueron directamente secuenciados utilizando el ABI Prism Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.), el cual está formado por un “Terminator Mix”, que contiene una mezcla de dideoxinucleótidos, cada uno de ellos marcados con un fluoróforo distinto, dNTPs, y una ADN polimerasa, de modo que se produce una reacción de polimerización, sintetizándose cadenas de ADN de diferente tamaño, dependiendo del momento en el que se incorpore el dideoxinucleótido, lo cual interrumpe la polimerización. Los componentes de la reacción de secuenciación fueron los siguientes: 2 µl de BigDye, 1,6 µl de cebador (2 µM), 1 µl de ADN purificado y 5,4 µl de agua. Los cebadores utilizados para la secuenciación de *gag*, *env* y *pol* se muestran en la Tabla 8.

El perfil térmico de la secuenciación fue: un ciclo de desnaturalización a 94°C durante 2 minutos; 25 ciclos de: a) desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, b) hibridación a 50° C durante 15 segundos, y c) extensión a 60°C durante 4 minutos.

Los productos de la reacción fueron analizados mediante electroforesis en un secuenciador capilar automático ABI Prism 3700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.), que detecta la fluorescencia emitida por los dideoxinucleótidos marcados incorporados a las cadenas de ADN al ser excitados por un láser.

**Tabla 8.** Cebadores utilizados para la secuenciación de *gag*, *env* y *pol*.

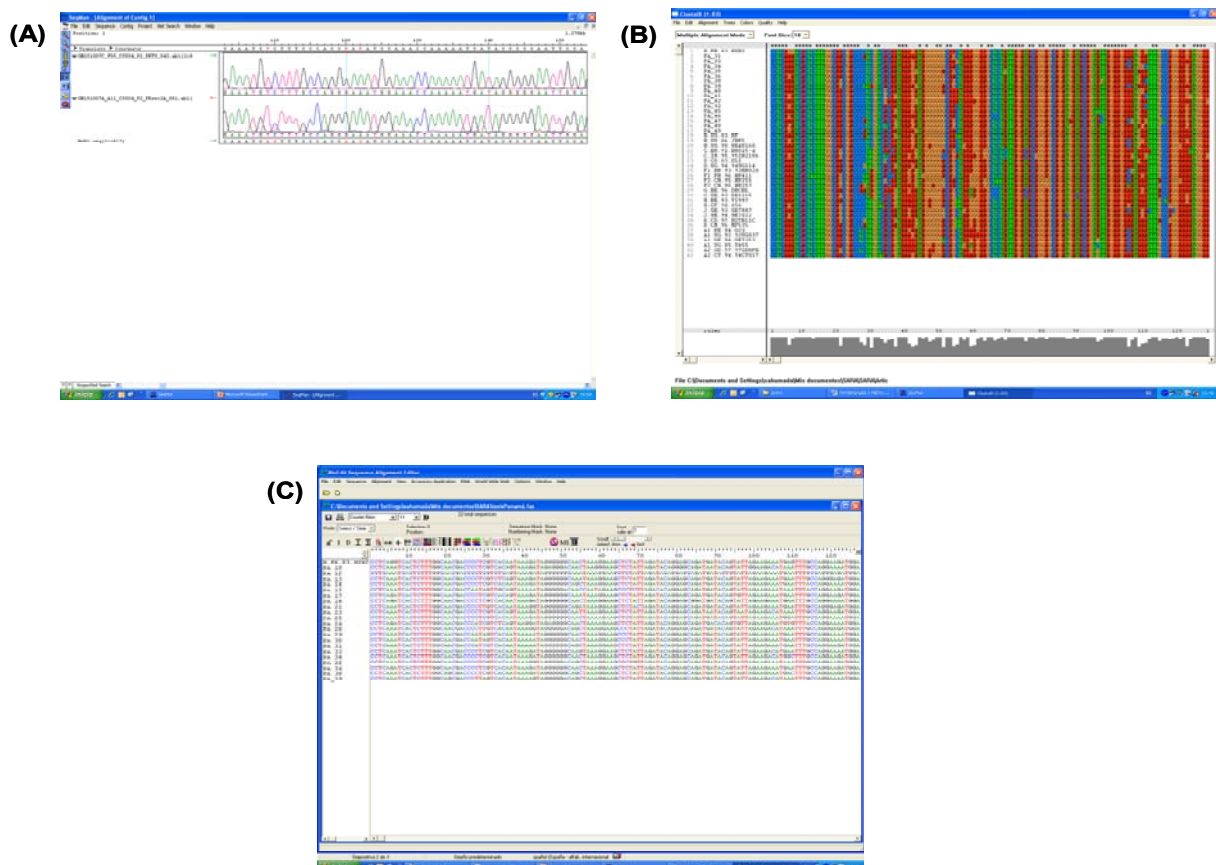
Región	Sense/ Antisense	Nombre	Secuencia	Posición en HXB2
<i>gag</i> (p17)	S	170U	5'-TCTCTAGCAGTGGCGCCCG AACAGGGAC-3'	626-648
	A	174GD	5'-TCTATCCCATTCTGCAGCTT CCTCATTGAT-3'	1402-1431
<i>env</i> (C2-C4)	S	27EU	5'-ATAAGCTTGCAGTCTAGCAG AAGAAGA-3'	7004-7030
	A	167ED	5'-TTCTCCAATTGTCCCTCATAT CTCCTCCTCCA-3'	7636-7665
<i>pol</i> (PR-TI)	S	RTsec1S	5'-CAAAAATTGGGCCTGAAAAT CCATA-3'	2692-2716
	A	PRsec2A	5'-GATGYGGTATTCCTAATTGRA CYTCCCA -3'	2811-2838
	S	PRTS	5'-AGCCCCACCAGAAGAGAGCT T-3'	2157-2177
	A	RTOA	5'-TGCCTCTGTTAATTGTTTAC ATCATTAGTGTG-3'	3630-3662

### 3.6. Corrección, ensamblaje y alineamiento de las secuencias

El análisis del secuenciador automático se muestra en forma de electroferograma, en el que se suceden picos de distintos colores, cada uno de los cuales corresponde a un nucleótido.

Los electroferogramas se corrigieron utilizando el programa Seqman II versión 6.1 (DNASTar, Madison, WI), que permite corregir los errores de lectura del secuenciador y ensamblar los electroferogramas correspondientes a secuencias solapadas (Figura 22).

Las secuencias se alinearon automáticamente utilizando el programa Clustal X versión 2.0 (266), corrigiéndose manualmente los alineamientos obtenidos mediante el programa BioEdit (26) (Figura 22).



**Figura 22.** Programas informáticos utilizados para el procesamiento de secuencias: (A) SeqMan II, corrección de secuencias. (B) Clustal X, alineamiento de secuencias. (C) BioEdit, corrección manual de alineamientos.

### 3.7. Clonaje de los productos de PCR

En algunos casos, la secuencia consenso de p17 (*gag*) y C2-C4 (*env*) era ilegible en determinados segmentos por la superposición de picos en el electroferograma, lo cual está causado por la amplificación de poblaciones heterogéneas del virus presente en la cuasiespecie. En estos casos, fue necesario obtener clones moleculares para tener una única molécula de ADN que permitiera obtener una secuencia sin mezclas.

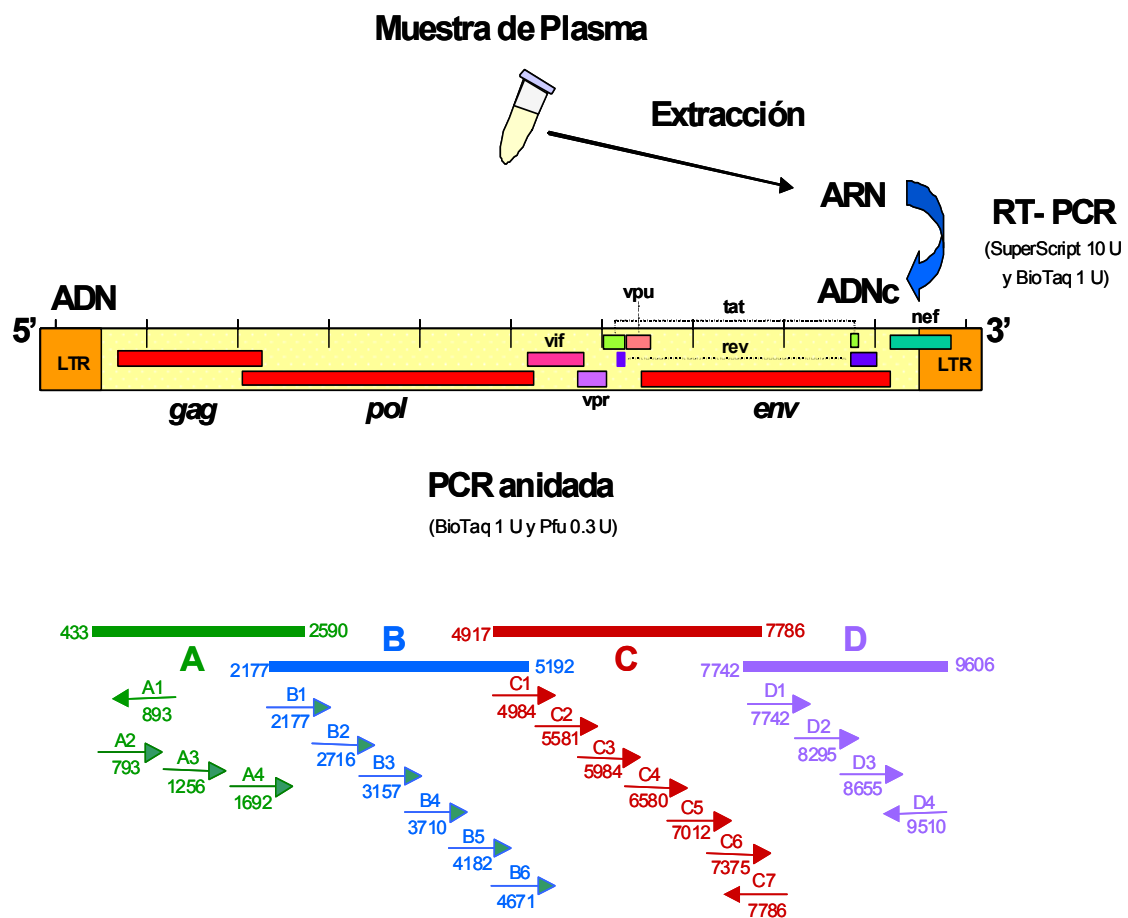
El producto de PCR fue clonado con el TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kit (Invitrogen, EE.UU.). El vector plásmido utilizado (pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup>) es un vector linearizado del que sobresalen timidinas en ambos extremos, lo cual permite realizar una ligación directa del producto de PCR generado por la Taq DNA polimerasa, que tiende a añadir adeninas a los extremos 3' de los amplicones. El vector contiene la secuencia codificante para el gen *lacZ* en dos segmentos que quedan separados por la linearización. El producto de PCR ligado en el vector se interpone entre los dos segmentos de la *lacZ*, impidiendo la expresión de la enzima. En caso de religación de los extremos del vector sin el inserto, se restaura la continuidad de la secuencia de *lacZ*, permitiéndose su expresión. La presencia o ausencia de actividad *lacZ*, indicativa de ligación sin o con inserto, respectivamente, se refleja en el color de la colonia en presencia de X-Gal (sustrato de la *lacZ*) en el medio de cultivo, que es azul cuando la *lacZ* es activa, o blanca en ausencia de actividad enzimática.

La reacción de ligación del producto de PCR en el vector se realizó con los siguientes componentes: 2 µl de vector, 1 µl de solución salina y 2 µl de producto de PCR. Tras incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos, se procedió a transformar químicamente células competentes de *E. coli* (bacterias TOP 10), seguido de incubación en medio SOC a 37°C con agitación a 200 rpm durante 1 hora, plaqueado de las bacterias en placas de LB conteniendo 50 µg/ml de ampicilina y X-Gal e incubación a 37°C toda la noche, todo ello siguiendo las instrucciones del fabricante del kit. Se seleccionaron 10 colonias blancas (clones positivos) por cada muestra, que fueron lisadas, amplificadas por PCR, purificadas y secuenciadas con el primer 174 (p17) y

167 (C2-C4), como se describió anteriormente en los puntos 3.3.1 a 3.3.2 y 3.4. a 3.6.

### 3.8. Amplificación y secuenciación del genoma completo del VIH-1

Las muestras analizadas en genoma completo se seleccionaron en base a los resultados obtenidos en PR-TI. El esquema general de trabajo utilizado para obtener el genoma completo del VIH-1 se muestra a continuación.



**Figura 23.** Esquema general de la metodología utilizada para amplificación y secuenciación del genoma completo del VIH-1.

La amplificación del genoma casi completo de VIH-1 (aproximadamente 9 Kb) se realizó mediante una RT-PCR, seguida de una PCR anidada en cuatro fragmentos solapantes (A, B, C y D) a partir del ARN extraído del plasma de individuos infectados. Los fragmentos tienen una longitud que oscila entre 1,8 a

3 Kb cada uno. El primer fragmento (A) abarca parte del 5' LTR, el gen *gag* y la proteasa (2,2 Kb); el segundo fragmento (B) abarca el gen *pol* entero (proteasa, transcriptasa inversa e integrasa) (3 Kb); el tercer fragmento (C) comprende los genes *vif*, *vpr*, el primer exón de *tat* y *rev*, *vpu* y *gp120* (2,9 Kb); y por último el cuarto fragmento (D) abarca *gp41*, el segundo exón de *tat* y *rev*, el gen *nef* y un segmento del 3' LTR (1,8 Kb). Las secuencias de los cebadores utilizados para la amplificación del genoma completo se muestran en la Tabla 9.

Cada reacción de RT-PCR se efectuó en un volumen final de 50 µl, conteniendo BioTaq DNA Polymersase (Bioline, London, UK.) 1 U, Pfu Turbo (Stratagene, CA, EE.UU.) 0,3 U, SuperScript<sup>TM</sup> III RNasa H<sup>-</sup> Reverse Transcriptase (GIBCO-BRL, CA, EE.UU.) (transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney carente de actividad RNasa H) 10 U, RNasin (Promega, Madison, EE.UU.) (inhibidor de RNasas) 10 U, trifosfatos de desoxinucleótidos (dNTPs) 0,2 mM cada uno, cebadores *sense* y *antisense* 0,4 mM cada uno, 5 µl de tampón de BioTaq 10 x [16 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 67 mM Tris-HCl (pH 8,8), y 0,01% Tween-20], MgCl<sub>2</sub> 2 mM, y 5 µl de muestra de ARN.

Dos microlitros del producto de la RT-PCR se utilizan para la PCR anidada, cuya mezcla de reacción, con un volumen final de 50 µl, contiene los mismos componentes que la RT-PCR, excepto los cebadores, que son internos con respecto a los de la RT-PCR, y el Superscript III y el RNasin, que se omiten de la reacción.

El perfil térmico para la RT-PCR fue: 30 minutos a 50°C para la retrotranscripción, seguido de 1 ciclo de desnaturalización a 94°C durante 2 minutos; 40 ciclos de: a) desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, b) hibridación a 55°C durante 30 segundos, c) extensión a 72°C durante 3 minutos, y por último, un ciclo de extensión final a 72°C durante 7 minutos.

El perfil térmico para la PCR anidada fue: un ciclo de desnaturalización a 94°C durante 2 minutos; 35 ciclos de: a) desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, b) hibridación a 55°C durante 30 segundos, c) extensión a 72°C

durante 3 minutos, y por último, un ciclo de extensión final a 72°C durante 7 minutos.

La correcta amplificación de los cuatro fragmentos se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, tal como se describe en el punto 3.3.1.

La purificación de los productos de PCR y la secuenciación de los mismos se realizó tal como se describe en los puntos 3.4. y 3.5.

La secuenciación de los cuatro fragmentos (A, B, C y D) se realizó en fragmentos solapantes de aproximadamente unas 500 bases cada uno. El fragmento A se secuenció en cuatro segmentos solapantes (A1-A4), el B en seis (B1-B6), el C en siete (C1-C7), y el D en cuatro (D1-D4) (Figura 23). Los cebadores utilizados para la secuenciación del genoma completo se muestran en la Tabla 10.

La corrección, ensamblaje y alineamiento de las secuencias de los fragmentos solapantes se realizó tal como se describe en el punto 3.6.

**Tabla 9.** Secuencia de los cebadores utilizados para la amplificación del genoma completo de VIH-1 en cuatro fragmentos solapantes: A, B, C y D.

RT-PCR				
Fragmento Amplificado	Sense/ Antisense	Nombre Secuencia	Secuencia	Posición en HXB2
<b>A1</b>	S	5'R1	5'-AGATCTTGAGCCTGGGAGCTCTC TGG-3'	473-497
	A	PROA	5'-TTTATGGCAAATACTGGAGTATTG TATGGA-3'	2711-2740
<b>B1</b>	S	PROS2b	5'-GCTAATTTTTTAGGGAARATYGCC TT-3'	2080-2107
	A	Pol-OA1	5'-TCTCCTGTATGCAGACCCCAATA TGT-3'	5242-5267
<b>C1</b>	S	3'HIV-OS3	5'-TACAGTGCAGGGAAAGAATAATA GACATAATA-3'	4809-4834
	A	gp120-OA	5'-TGTCTGGCCTGTACCGTCAGC G-3'	7831-7852
<b>D1</b>	S	gp41- Nef-OS	5'-AAAAACCAYTAGGAGTAGCACC CAC-3'	7693-7720
	A	Nef-AS4	5'-AGAGAGACCCAGTACAGGCAAA AAGC-3'	9523-9548
PCR Anidada				
<b>A2</b>	S	5'RU5S	5'-GCTTCAAGTAGTGTGTGCCCCGT CTG-3'	546-570
	A	PRTA	5'-TTTATGGCAAATACTGGAGTATT GTATGGA-3'	2590-2610
<b>B2</b>	S	PRTS	5'-AGCCCCACCAGAAGAGAGCT T-3'	2157-2177
	A	5'HIV-NA	5'-CCCTAGTGGGATGTGTACTTCT GAACTTA-3'	5192-5220
<b>C2</b>	S	3'HIVOS	5'-CAAAATTTTCGGGTTTATTACCG GGACA-3'	4890-4917
	A	gp41AS	5'-GCTTCCTGCTGCTCCCAAGAAC C-3'	7786-7808
<b>D2</b>	S	gp120S	5'-ACCAAGGCAAAGAGAAGAGTGT G-3'	7719-7742
	A	3'Nef3	5'-GTACAGGCAAAAAGCAGCTGCT TATATG-3'	9510-9537



**Tabla 10.** Secuencia de los cebadores utilizados para la secuenciación del genoma completo.

Fragmento A				
Fragmento Amplificado	Sense/ Antisense	Nombre	Secuencia	Posición en HXB2
A1	A	Gag1A	5'-AGCTCCCTGCTTGCCCAT A-3'	893-911
A2	S	F2nst	5'-GCGGAGGCTAGAAGGAGA GAGATGG-3'	769-793
A3	S	Gagseq1	5'-CATATCACCTAGAACTTTTRA ATGCATGGGT-3'	1227-1256
A4	S	Gagseq3	5'-ATCCTGGGATTAAATAAAAT AGTAAGAATGTATAG-3'	1588-1622
Fragmento B				
B1	S	PRTS	5'-AGCCCCACCAGAAGAGAGC TT-3'	2157-2177
B2	S	RTsec1S	5'-CAAAAATTGGGCCTGAAAAT CCATA-3'	2692-2716
B3	S	RTDS-N-S	5'-ATAGGGCAGCATAGARCAA AAATAGA-3'	3132-3157
B4	S	Polseq3	5'-GAAAGCATAGTRATATGGGG AAAGACTCCT-3'	3681-3710
B5	S	INTS	5'-AGCACACAAAGGAATTGGAG GAA-3'	4160-4182
B6	S	IN-MED-S	5'-GGCATTCCCTACAATCCCCA AAGTC-3'	4647-4671
Fragmento C				
C1	S	3'HIV-NS2	5'-GGAAAGGTGAAGGGGCAGT AGTAATACA-3'	4957-4984
C2	S	gp120seq1	5'-AGATGGAACAAGCCCCAGAA GACCA-3'	5557-5581
C3	S	gp120seq2	5'-GCATCTCCTATGGCAGGAAG AAGC-3'	5961-5984
C4	S	gp120seq3	5'-TTTATGGGATCAAAGCCTAAA RCCATG-3'	6554-6580
C5	S	ES7b	5'-CCAGTRGTATCAACTCAACTG CTGTAAATGG-3'	6981-7012

<b>C6</b>	S	gp120seq5	5'-AGTTTTTAATTGTRGAGGRGAA TTTTTCTA-3'	7347-7375
<b>C7</b>	A	gp41AS	5'-GCTTCCTGCTGCTCCCAAGA ACC-3'	7786-7808
<b>Fragmento D</b>				
<b>D1</b>	S	gp120S	5'-ACCAAGGCAAAGAGAAGAGT GGTG-3'	7719-7742
<b>D2</b>	S	gp41seq-1	5'-TGTGGTATATAAAAAATATTCA TAATGATAGTAGGAG-3'	8260-8295
<b>D3</b>	S	NefS4	5'-AGTCAGGAACTAAAGAATAG TG-3'	8634-8655
<b>D4</b>	A	3'nef3	5'-GTACAGGCAAAAAGCTGCTT ATATG-3'	9510-9537

### 3.9. Análisis filogenéticos

#### 3.9.1. Construcción de árboles filogenéticos

Los árboles filogenéticos fueron contruidos por diferentes métodos: unión por vecindad (*neighbor-joining*, NJ), con el programa MEGA versión 4.0 (454), máxima verosimilitud (*maximum likelihood*, ML), con el programa RAXML versión 7.2.8 (440), y bayesiano con el programa MrBayes versión 3.1.2 (227, 396).

Los árboles NJ se construyeron utilizando una matriz de distancia genéticas basadas en el modelo de dos parámetros de Kimura, determinando la reproducibilidad estadística de los nodos mediante *bootstrapping* utilizando 1.000 réplicas. Los árboles de ML fueron contruidos con el modelo evolutivo general reversible en el tiempo, con heterogeneidad en ritmos de evolución entre posiciones, modelada de acuerdo con una distribución gamma, y una proporción de sitios invariables (GTR+ $\Gamma$ +I), determinándose la estabilidad de los nodos mediante *bootstrapping* utilizando 100 réplicas. Como regla general, se consideraron clados bien apoyados aquellos que tenían un valor de *bootstrap*  $\geq 70$  %.

Para la construcción de árboles mediante inferencia bayesiana, se utilizó el modelo evolutivo GTR+ $\Gamma$ +I. Se dejaron correr dos carreras simultáneas e independientes con 8 cadenas, muestreando cada 500 generaciones. Los análisis se continuaron hasta la convergencia de ambas cadenas, definida por una desviación estándar de frecuencias divididas (*standard deviation of split frequencies*) < 0,01. El apoyo estadístico de los nodos fue derivado del consenso mayoritario de los árboles muestreados, descartándose el 50% de los árboles iniciales como *burn-in*. Los árboles filogenéticos generados fueron visualizados con el programa Treeview versión 1.6.6 (338). Se consideró que un nodo estaba bien apoyado cuando su probabilidad posterior (PP) era  $\geq 0,95$ .

### 3.9.2. Análisis de recombinación

Para analizar posible recombinación intra e intersubtipo de las secuencias completas, se utilizó el método de *bootscanning* implementado en el programa Simplot versión 3.5.1 (277). Los resultados de los análisis de *bootscanning* realizados mediante este programa se presentan mediante una gráfica, en la que el eje de abscisas (x) representa la posición en la secuencia analizada del punto medio de una ventana de longitud predeterminada, que se desplaza a lo largo de la secuencia, y el eje de ordenadas (y) representa el valor de *bootstrap* con el que la secuencia analizada agrupa en un árbol filogenético con las secuencias de referencia dentro de cada ventana.

El gráfico obtenido permite detectar la presencia de recombinación y apreciar la estructura en mosaico del genoma analizado, ya que mediante un código de colores se distinguen los valores de *bootstrap* correspondientes a cada secuencia de referencia, de manera que se puede detectar un punto de recombinación cuando se entrecruzan las líneas correspondientes a distintas referencias, indicando un cambio en las relaciones filogenéticas de la secuencia analizada, siempre y cuando los valores de *bootstrap* sean  $\geq 70\%$ .

En los análisis de *bootscanning* realizados con Simplot se utilizaron ventanas de 800 nt para analizar recombinación intrasubtipo y de 400 nt para recombinación intersubtipo, desplazándose en incrementos de 40 nt. Los árboles filogenéticos fueron construidos mediante el algoritmo NJ, basado en el

modelo de sustitución de dos parámetros de Kimura, con un cociente transición/transversión de 2, evaluándose la estabilidad de los nodos mediante 100 réplicas de *bootstrap*. Los segmentos localizados entre puntos de recombinación de los virus identificados como recombinantes mediante Simplot fueron analizados también mediante máxima verosimilitud utilizando RAxML y mediante análisis bayesiano utilizando MrBayes.

La presencia de recombinación intrasubtipo en genomas completos de virus de subtipo B también se analizó construyendo árboles filogenéticos de máxima verosimilitud de fragmentos de 1 kb, con un solapamiento de 0,5 kb entre fragmentos consecutivos, utilizando el programa RAxML.

### 3.10. Análisis de datación molecular

El ritmo de sustitución de nucleótidos y la edad del ancestro común más reciente (*time of most recent common ancestor*, tMRCA) de los *clusters* filogenéticos identificados en este estudio se estimaron mediante un método bayesiano implementado en BEAST, basado en cadenas de Markov y que utiliza el método denominado Monte Carlo (*Markov chain Monte Carlo*, MCMC) (152). La distribución posterior de los ritmos de evolución en PR-TI se obtuvo a partir de alineamientos de secuencias de subtipo B obtenidas de la base de datos de Los Alamos (14) y de muestras procesadas en la Unidad de Biología y Variabilidad del VIH, en la que se realizó este trabajo, distribuidas uniformemente a lo largo de los años, abarcando el mayor intervalo de tiempo posible. Los análisis se realizaron aplicando el modelo de sustitución SRD06 [HKY – que asume diferentes ritmos de transversiones y transiciones y frecuencias de bases variables - con heterogeneidad en los ritmos de sustitución entre posiciones de acuerdo con una distribución  $\Gamma$  y dos particiones en las posiciones de los codones ( $1^a+2^a$  y  $3^a$ )], que se ha demostrado ser más apropiado en secuencias codificantes de virus (423), el modelo demográfico *Bayesian Skyline Plot*, que es el que tiene menos constricciones demográficas (153), y un reloj molecular relajado con distribución *log* normal, que permite variaciones en los ritmos de evolución a lo largo de la filogenia sin asumir una autocorrelación de ritmos entre ramas ancestrales y descendientes (151). Los análisis de MCMC se corrieron muestreando cada 1000 generaciones, con un

*burn-in* inicial del 10% que es descartado, hasta alcanzarse la convergencia, lo cual se evaluó mediante el programa Tracer. Para cada carrera, el tamaño estimado de la muestra fue  $> 200$ , lo que indica que ha habido suficiente mezcla de la cadena de Markov y muestreo de parámetros. La distribución posterior de los ritmos de evolución obtenidos de las secuencias analizadas de esta manera se incorporó como distribución de probabilidad previa del ritmo de evolución utilizado en los análisis de los *clusters*. La incertidumbre en las estimaciones obtenidas se reflejó en los valores del 95% de densidad posterior más alta (95% *highest posterior density*, 95% HPD).

### 3.11. Análisis de resistencia a medicamentos antiretrovirales

Las secuencias de PR-TI en el gen *pol* fueron analizadas para determinar la presencia de mutaciones de resistencia a medicamentos antiretrovirales con el “*HIV db Program*” de la base de datos de la Universidad de Stanford (6, 386). Este programa permite analizar secuencias de PR-TI, proporcionando información sobre el nivel de resistencia a los 20 fármacos utilizados en la clínica contra el VIH-1 y aprobados por la FDA.

Para realizar el análisis, el programa realiza un alineamiento de la secuencia de interés contra la secuencia de referencia de subtipo B, de modo que se detectan las posibles inserciones, deleciones, y mutaciones presentes en la secuencia. Además, nos indica las posiciones donde hay codones de parada o cambio de marco de lectura y aquellas en las que hay ambigüedades (debido, por ejemplo, a la presencia de una mezcla de diferentes nucleótidos en una posición). También, señala la presencia de mutaciones inusuales, definidas como mutaciones no asociadas a resistencia frente a medicamentos y que están presentes en una proporción  $< 0,05\%$  dentro del grupo M del VIH-1, proporciona información del subtipo al que corresponde la secuencia, de acuerdo con un análisis de similitud, y caracteriza las mutaciones que producen resistencia a fármacos.

El programa asigna una puntuación de penalización (*penalty score*) a cada mutación de resistencia, de acuerdo con su impacto en la resistencia a antirretrovirales, en base a información obtenida en estudios publicados.

Dichas puntuaciones se suman, y la puntuación total obtenida permite inferir distintos niveles de resistencia a los fármacos, los cuales son designados como:

**1) Susceptible:** puntuación de 0 a 9. No hay evidencia de la disminución en la susceptibilidad del virus a un determinado fármaco.

**2) Nivel de resistencia de bajo potencial:** puntuación de 10 a 14. El virus es susceptible y presenta mutaciones que podrían ser indicativas de exposición previa a medicamentos antirretrovirales.

**3) Nivel de resistencia bajo:** puntuación de 15 a 29. Los virus que presentan esta resistencia tienen la susceptibilidad a antirretrovirales reducida *in vitro* y los pacientes con este genotipo viral tienen una respuesta subóptima al tratamiento comparado con el tratamiento en la cepa salvaje (*wild type*).

**4) Nivel de resistencia intermedio:** puntuación de 30 a 59. El genotipo viral sugiere una resistencia mayor que en el nivel de resistencia bajo, pero menor que en el nivel de resistencia alto.

**5) Nivel de resistencia alto:** puntuación superior a 60. El genotipo viral es similar a los aislados en el nivel de resistencia alto *in vitro* y los pacientes con este genotipo viral tendrán escasa o nula respuesta virológica al tratamiento con el medicamento antirretroviral correspondiente.

### 3.12. Análisis estadístico

Las correlaciones estadísticas de los *clusters* filogenéticos con áreas geográficas o vías de transmisión fueron analizadas con el test exacto de Fisher.

# **RESULTADOS**

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Análisis filogenético de las secuencias de los genes *gag*, *env* y *pol*

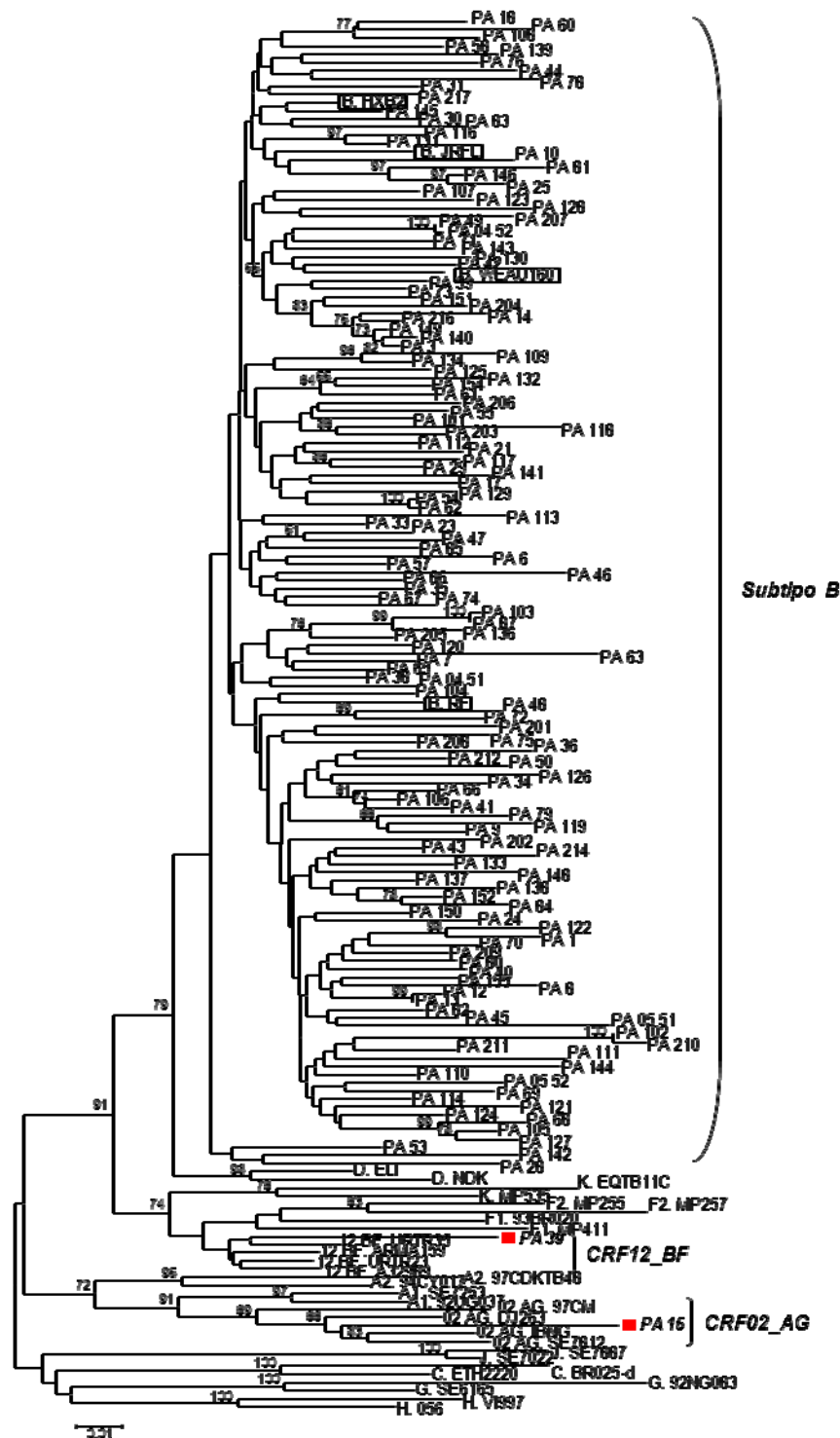
Se obtuvo amplificación en al menos uno de los segmentos en 147 (90,2%) muestras. De ellas, en 117 (79,6%) se consiguieron amplificar los tres segmentos, en 25 (17%) se amplificaron dos, y en 5 (3,4%) se amplificó solamente un segmento (Tabla 11).

Los análisis filogenéticos de las secuencias parciales de los genes *gag* (p17), *env* (C2-C4) y *pol* (PR-TI) mostraron que la gran mayoría (98,6%) de las infecciones por VIH-1, incluyendo todas las analizadas en individuos asintomáticos, están causadas por virus del subtipo B (Figuras 24-26). Solamente dos pacientes con SIDA portaban virus de formas genéticas no B, el primero de los cuales agrupaba con referencias de la CRF12\_BF en los tres genes, mientras el segundo agrupaba con referencias de la CRF02\_AG en *gag* y *env* y con el subsubtipo A3 en *pol* (Figuras 24-26).

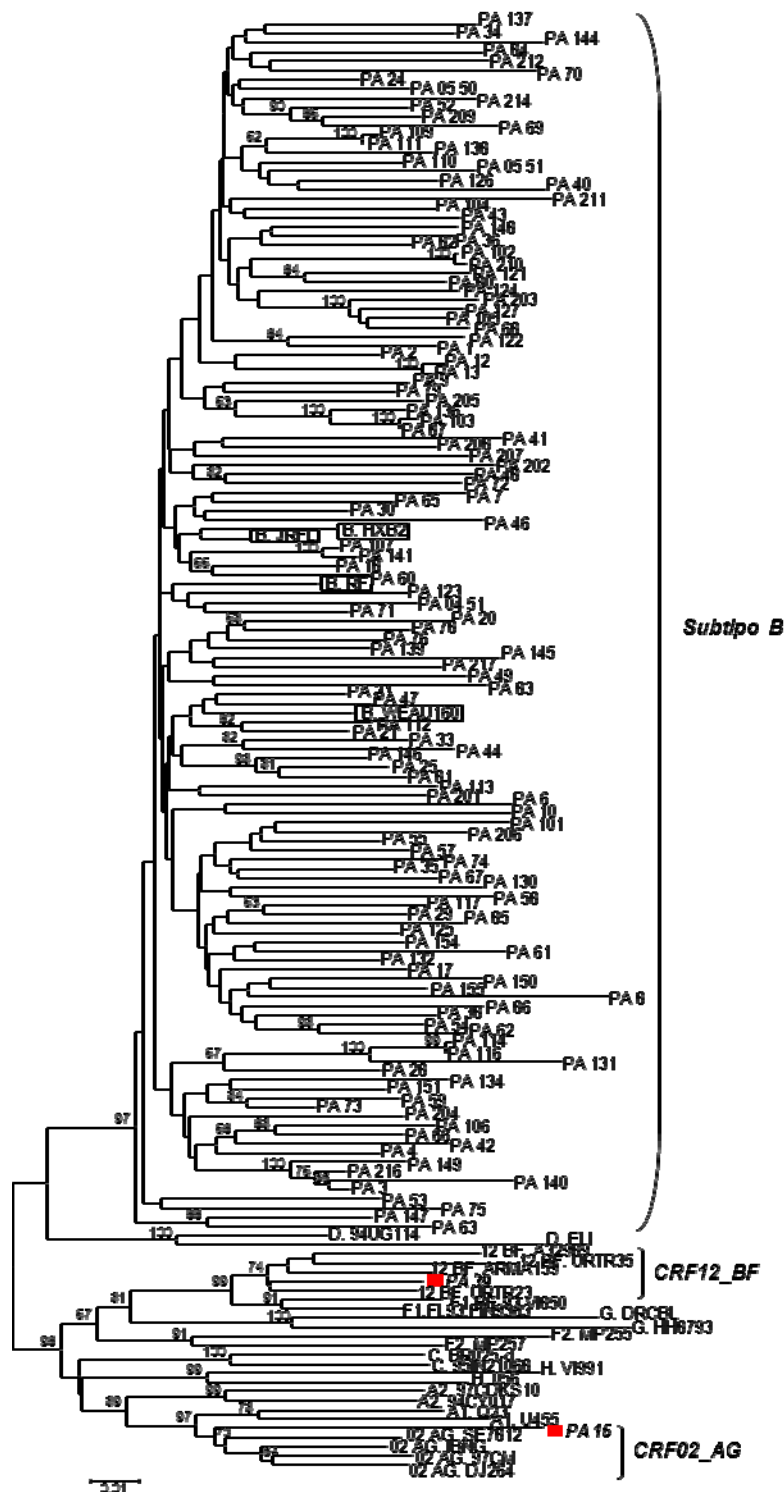
**Tabla 11.** Muestras amplificadas en cada gen.

Gen Amplificado	Muestras		Total (N=163)
	SIDA (N=107)	Asintomáticos (N=56)	
<i>gag, env y pol</i>	77	40	117
<i>gag y env</i>	8	1	9
<i>gag y pol</i>	4	10	14
<i>env y pol</i>	1	1	2
solo <i>gag</i>	0	0	0
solo <i>env</i>	2	0	2
solo <i>pol</i>	1	2	3
total <i>gag</i>	89	51	140
total <i>env</i>	88	42	130
total <i>pol</i>	83	53	136
Al menos un fragmento	93	54	147

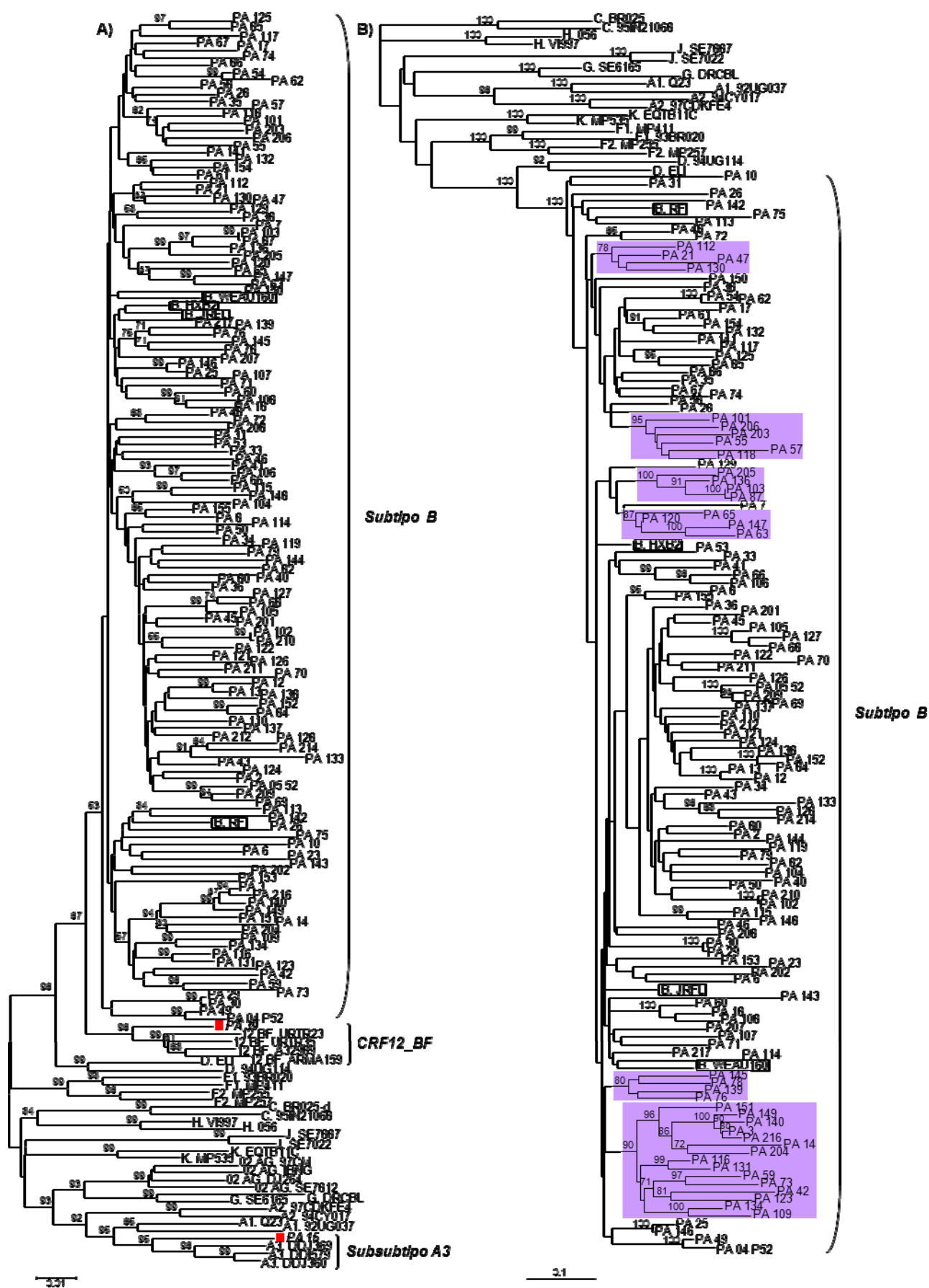




**Figura 24.** Árbol filogenético de unión por vecindad (NJ) de secuencias de *gag* (p17) de Panamá. Los nombres de los virus de Panamá empiezan con PA. Los nombres de las referencias del subtipo B están enmarcados. Los dos virus de subtipo no B de Panamá están marcados con cuadrados rojos y sus nombres están en negrita. El subtipo y las CRFs con los que agrupan los virus de Panamá están indicados a la derecha de los corchetes correspondientes. Sólo se muestran valores de *bootstrap*  $\geq 50\%$ .



**Figura 25.** Árbol filogenético de unión por vecindad (NJ) de secuencias de *env* (C2-C4) de Panamá. Los nombres de los virus de Panamá empiezan con PA. Los nombres de las referencias del subtipo B están enmarcados. Los dos virus de subtipo no B de Panamá están marcados con cuadrados rojos y sus nombres están en negrita. El subtipo y las CRFs con los que agrupan los virus de Panamá están indicados a la derecha de los corchetes correspondientes. Sólo se muestran valores de *bootstrap*  $\geq 50\%$ .



**Figura 26.** Análisis filogenético de secuencias de *pol* (PR-TI) de Panamá. **(A)** Árbol filogenético de unión por vecindad. **(B)** Árbol filogenético de máxima verosimilitud de los virus de subtipo B. Los nombres de los virus de Panamá empiezan con PA. Los nombres de las referencias del subtipo B están enmarcados. Los dos virus de subtipo no B de Panamá están marcados con cuadrados rojos y sus nombres están en negrita. Los subtipos y CRFs con los que agrupan los virus de Panamá están indicados a la derecha de los corchetes correspondientes. Los *clusters* del subtipo B de Panamá con  $\geq 4$  virus en el análisis de ML se señalan con rectángulos morados. Sólo se muestran valores de *bootstrap*  $\geq 50\%$ .

En el árbol filogenético de las 134 secuencias de PR-TI del subtipo B obtenido por el método de máxima verosimilitud, se observan 6 *clusters* filogenéticos de 4 o más secuencias apoyados por valores de *bootstrap*  $\geq 70\%$  que en total comprenden 37 (27,6%) virus, destacando un *cluster* con 15 virus (Figura 26B). Cuatro de estos *clusters* también están fuertemente apoyados en el árbol obtenido mediante inferencia bayesiana (Figura 27), estando los dos *clusters* restantes agrupados en un *cluster* mayor junto con otros dos virus. El análisis bayesiano también permitió identificar un *cluster* adicional de 43 virus. En el análisis inicial, este *cluster* estaba apoyado por una probabilidad posterior (PP) de 0,89 (Figura 27), pero al repetir el análisis excluyendo dos virus que ramificaban en posición basal con respecto al *cluster*, la PP aumentaba a 1 (Figura 28). La exclusión de otro virus que ramificaba basalmente con respecto a otro *cluster* de 14 virus también produjo un incremento de la PP de 0,9 a 0,96. En total, los virus de Panamá que agrupan dentro de *clusters* filogenéticos de 4 o más secuencias suman 96, que representan el 71,6% de los 134 virus del subtipo B. Además, la gran mayoría de las secuencias de los virus de Panamá agrupan dentro del subclado pandémico del subtipo B (186), excepto 6 secuencias que ramifican por fuera del mismo, junto con el virus de referencia RF, procedente de Haití, país en el que se inició la propagación del subtipo B (186). Los *clusters* intrasubtipo identificados mediante el análisis bayesiano fueron designados B-PA1 (n=43), B-PA2 (n=15), B-PA3 (n=14), B-PA4 (n=10), B-PA5 (n=6), B-PA6 (n=4) y B-PA7 (n=4) (Figura 27). La distribución de los 7 *clusters* filogenéticos del subtipo B de Panamá de acuerdo con las áreas geográficas y los factores de riesgo se muestran en la Tabla 12. El *cluster* B-PA1 estaba significativamente asociado con Panamá oriental (95%, frente al 76% en el total de muestras de Panamá) y los *clusters* B-PA2 y B-PA4 con Panamá occidental (60% en cada uno de los *clusters* comparado con 24% en el total de muestras de Panamá) ( $p < 0,05$ , según el test exacto de Fisher en los tres casos) (Figura 29). No se encontró ninguna relación estadísticamente significativa entre los *clusters* y las vías de transmisión (Tabla 12).

Los análisis mediante *bootscanning* en PR-TI de los dos virus de subtipo no B mostraron que se trataba de formas recombinantes secundarias. PA\_15, que en el árbol NJ de PR-TI agrupa con las referencias de subsubtipo A3 (Figura

26A), corresponde a un recombinante CRF02\_AG/A3, con la mayor parte de la PR agrupando con la CRF02\_AG y el segmento 3' de PR y la TI con el subsubtipo A3 (Figura 30A). PA\_39, que en el árbol NJ de PR-TI agrupa con las referencias de CRF12\_BF (Figura 26A), corresponde a un recombinante CRF12\_BF/B, en el que la PR agrupa con la CRF12\_BF y la TI es recombinante entre el subtipo B y la CRF12\_BF (Figura 30B).

**Tabla 12.** Distribución de los siete *clusters* filogenéticos del subtipo B de Panamá según el área geográfica y los factores de riesgo.

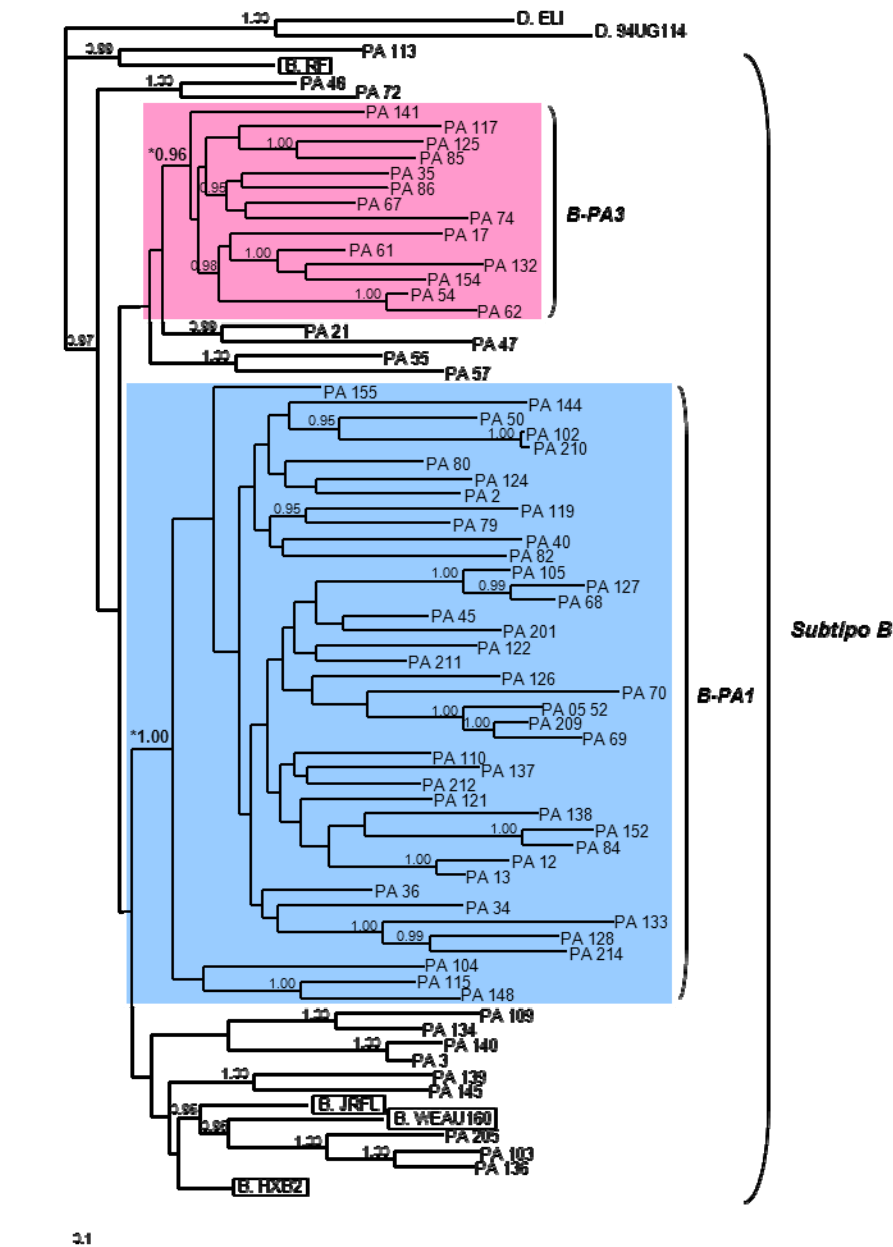
Clusters	Área Geográfica					Factores de Riesgo				
	Panamá				Desconocido	Heterosexual		Homo/Bisexual		Desconocido
	Oriental		Occidental							
	n	% <sup>a</sup>	n	% <sup>a</sup>		n	% <sup>a</sup>	n	% <sup>a</sup>	
B-PA1 <sup>b</sup>	39	95	2	5	2	26	81	6	19	11
B-PA2 <sup>b</sup>	6	40	9	60	0	6	86	1	14	8
B-PA3	9	69	4	31	1	5	55,5	4	44,4	5
B-PA4 <sup>b</sup>	4	40	6	60	0	4	67	2	33	4
B-PA5	5	83,3	1	16,7	0	4	100	0	0	2
B-PA6	3	75	1	25	0	3	100	0	0	1
B-PA7	4	100	0	0	0	2	66,6	1	33,3	1
Total	96	76,2	30	23,8	8	72	78,3	20	21,7	42
Subtipo B <sup>c</sup>										

<sup>a</sup>Los porcentajes fueron calculados utilizando solamente muestras de las que se dispone de información del lugar de residencia y conducta de riesgo, respectivamente.

<sup>b</sup>El *cluster* B-PA1 estaba significativamente asociado con Panamá oriental y los *clusters* B-PA2 y B-PA4 con Panamá occidental ( $p < 0.05$ , test exacto de Fisher).

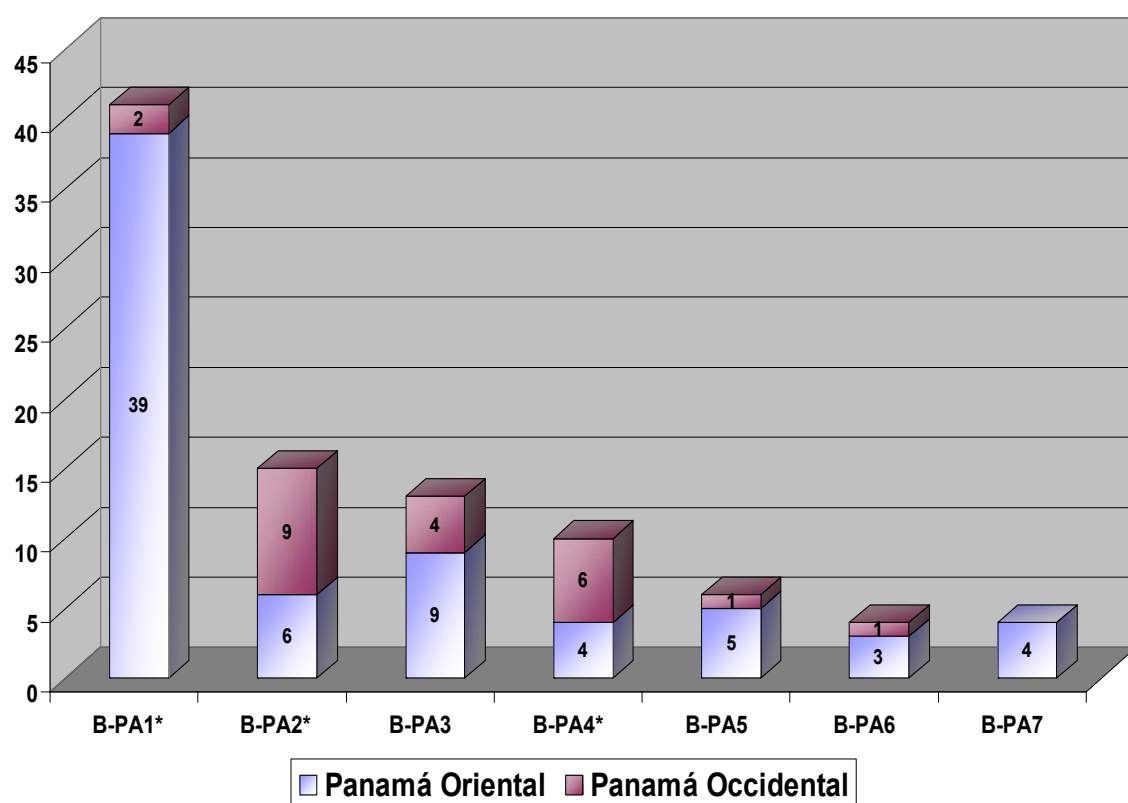
<sup>c</sup>Incluye todas las muestras del subtipo B analizadas en PR-TI.

## Resultados

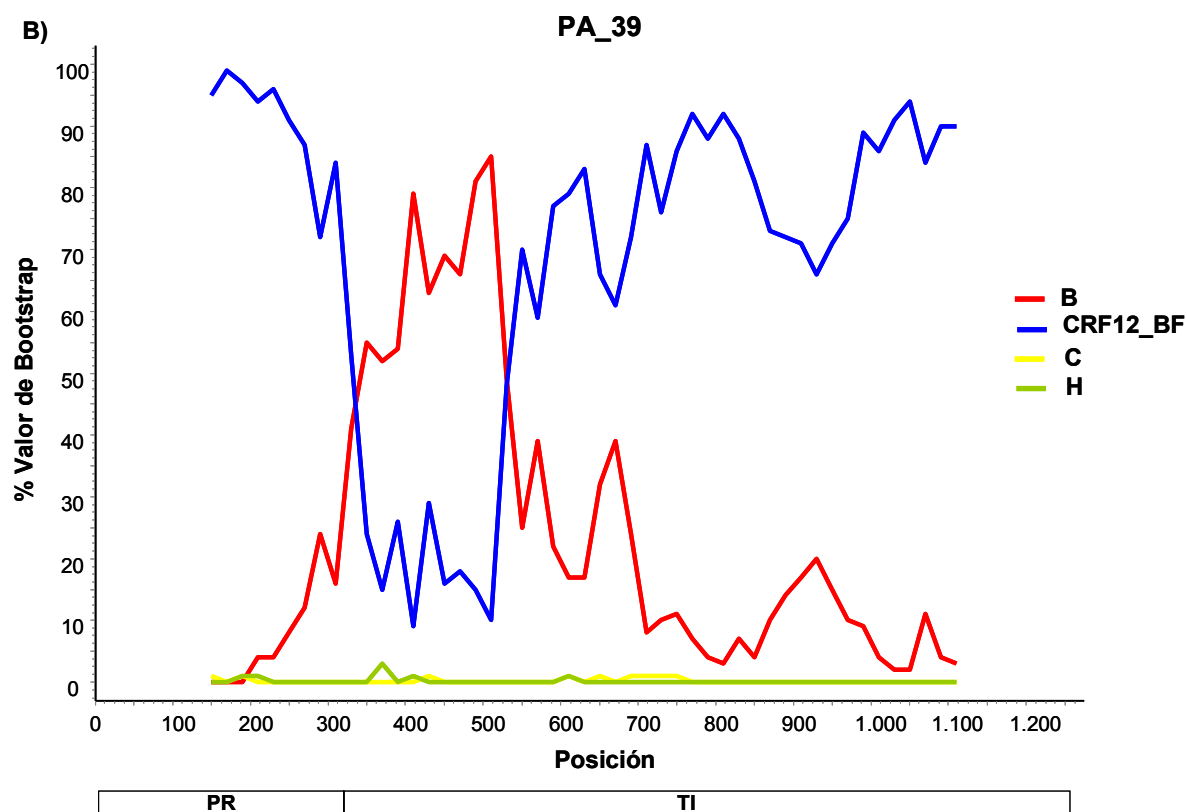
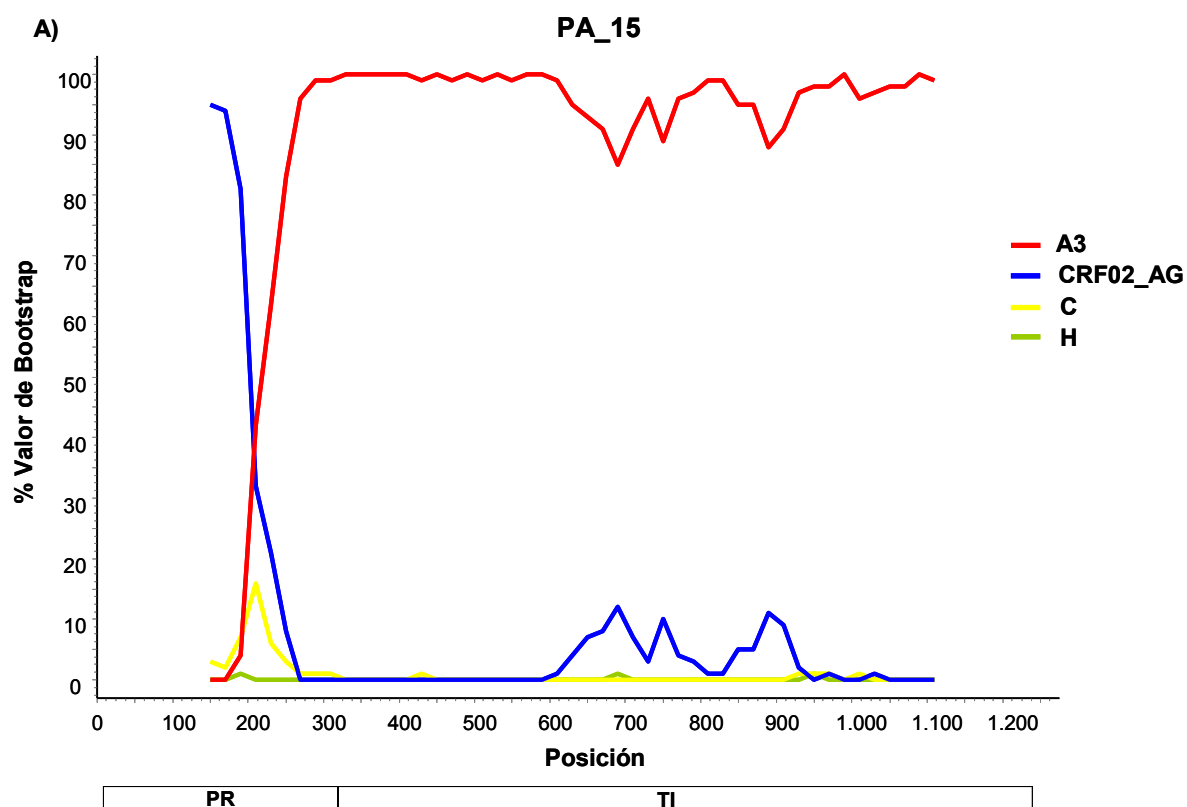


**Figura 28.** Árbol filogenético bayesiano de las secuencias de PR-TI de los *clusters* B-PA1 y B-PA3, tras excluir las secuencias PA\_46 y PA\_208, que en el análisis inicial ramificaban basalmente con respecto al *cluster* B-PA1, y PA\_58, que ramificaba basalmente con respecto al *cluster* B-PA3. Se observa un incremento de la PP del *cluster* B-PA1 de 0,90 a 1,00 y del *cluster* B-PA3 de 0,89 a 0,96. Los nombres de los virus de Panamá empiezan con PA. Los nombres de las referencias del subtipo B están enmarcados. Los nombres de los dos *clusters* del subtipo B de Panamá están indicados a la derecha de los corchetes correspondientes. Sólo se muestran los nodos con probabilidad posterior  $\geq 0,95$ .





**Figura 29.** Distribución de los *clusters* filogenéticos del subtipo B de acuerdo con las áreas geográficas de Panamá. \*Las asociaciones con Panamá oriental del *cluster* B-PA1 y con Panamá occidental de los *clusters* B-PA2 y B-PA4 son estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ , test exacto de Fisher).



**Figura 30.** Análisis mediante *bootscanning*, utilizando el programa Simplot v.3.5, de los dos virus de subtipo no B de Panamá. El eje de abscisas representa la posición de los nucleótidos en el punto medio de la ventana desde el extremo 5' de la PR, y el eje de ordenadas representa el valor de *bootstrap* (%) con el que la secuencia analizada agrupa con las secuencias de referencia dentro de cada ventana. Se utilizó una ventana de 300 nt desplazándose en incrementos de 20 nt. **(A)** Análisis de PA\_15. En el análisis inicial, se utilizaron referencias de todos los subtipos, además de la CRF02\_AG y el subsubtipo A3 (con los cuales PA\_15 agrupaba en los árboles filogenéticos de *gag* y *env* y *pol*, respectivamente); en un análisis posterior (que se muestra en la figura) se utilizaron solamente las referencias (subsubtipo A3 y CRF02\_AG) que agrupaban con PA\_15 con un valor de *bootstrap*  $\geq 70\%$  en los análisis iniciales, además de los subtipos C y H como grupos externos. **(B)** Análisis de PA\_39. En el análisis inicial, se utilizaron referencias de todos los subtipos, además de la CRF12\_BF (con la cual PA\_39 agrupaba en los árboles filogenéticos de *gag*, *env* y *pol*); en un análisis posterior (que se muestra en la figura) se utilizaron solamente las referencias (subtipo B y CRF12\_BF) que agrupaban con PA\_39 con un valor de *bootstrap*  $\geq 70\%$  en los análisis iniciales, además de los subtipos C y H como grupos externos.

#### 4.2. Datación molecular del origen de los *clusters* identificados en PR-TI

El origen temporal de los *clusters* se estimó mediante el método bayesiano implementado en el programa BEAST (152). Como se describió en el apartado de métodos, inicialmente se estimó el ritmo de evolución utilizando secuencias de PR-TI de subtipo B con fechas de recolección distribuidas uniformemente a lo largo de los años. El promedio de la estimación obtenida fue de  $1,745 \times 10^{-3}$  sustituciones/sitio/año, que se incorporó, junto con el error estándar estimado, como parámetro previo en el subsiguiente análisis de los *clusters* de Panamá. Para realizar dichos análisis, se excluyeron 8 secuencias que contenían mutaciones de resistencia a ARV, de acuerdo con los análisis realizados mediante el programa de la base de datos de la Universidad de Stanford (6). Una de las secuencias excluidas pertenecía al *cluster* B-PA6, que comprende 4 secuencias, quedando solo con 3, por lo que se excluyó del análisis de datación molecular. Los promedios de los tMRCA y los correspondientes intervalos del 95% HPD de los 6 *clusters* restantes obtenidos se muestran en la Tabla 13. De acuerdo con los promedios de las fechas estimadas de los tMRCAs, el origen de 5 de los *clusters* se sitúa en la década de 1970 (1971,6 a 1977,8), con la única excepción de B-PA5, cuyo tMRCA se estima en 1980,5, abarcando el conjunto de los 95% HPD de los 6 *clusters* el intervalo 1966,8 – 1984,6.

**Tabla 13.** Datación molecular del origen de los *clusters* de subtipo B de Panamá.

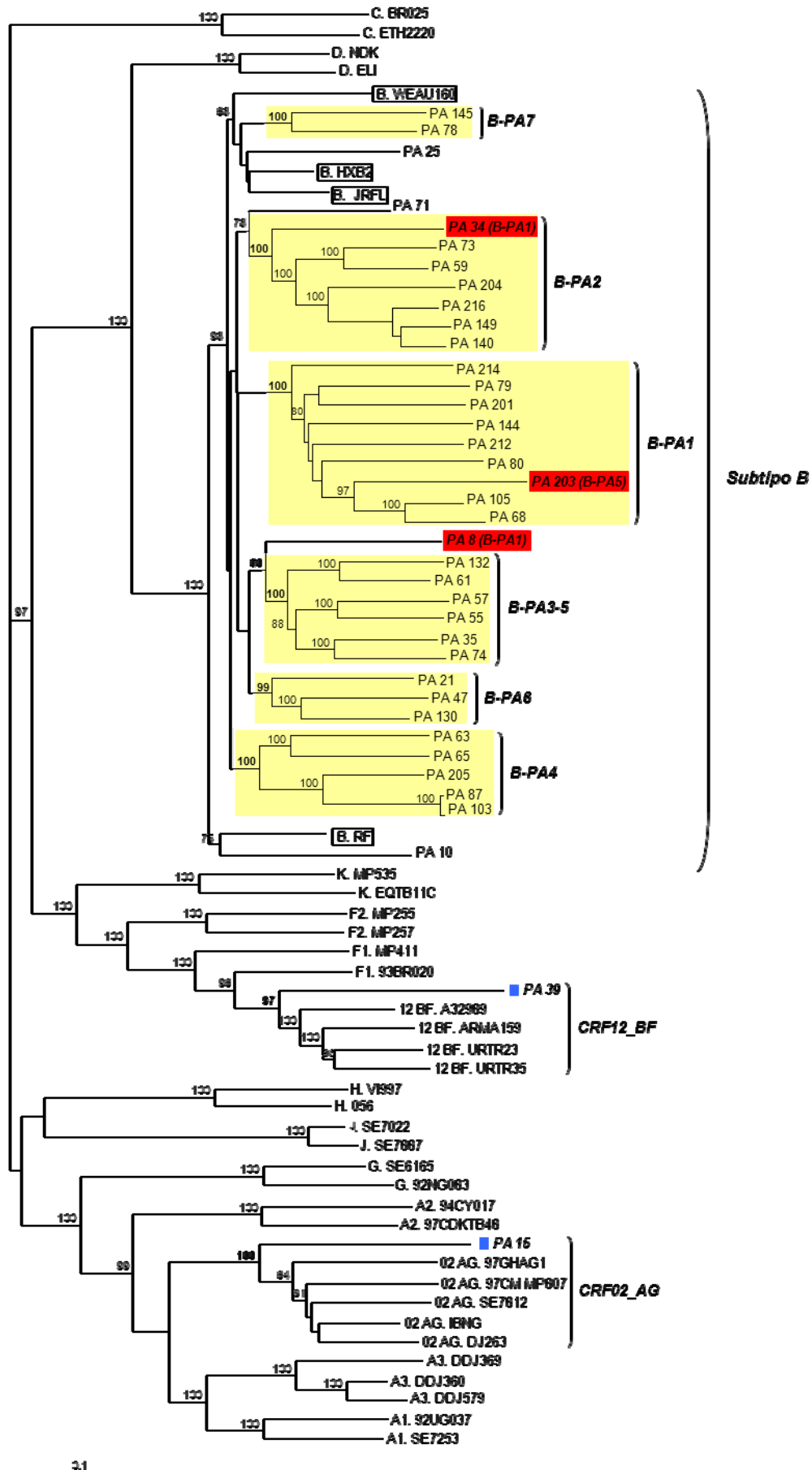
<i>Cluster</i>	Nº de virus	tMRCA*
<b>B-PA1</b>	43	1971,6 (1966,8 – 1976,1)
<b>B-PA2</b>	15	1975,1 (1970,9 – 1979,2)
<b>B-PA3</b>	14	1976,4 (1973,0 – 1980,0)
<b>B-PA4</b>	10	1974,9 (1970,4 – 1979,1)
<b>B-PA5</b>	6	1980,5 (1975,3 – 1984,6)
<b>B-PA7</b>	4	1977,8 (1973,1 – 1982,7)

\*Los datos representan años del calendario, con los valores promedios, y, entre paréntesis, el intervalo del 95% HPD.

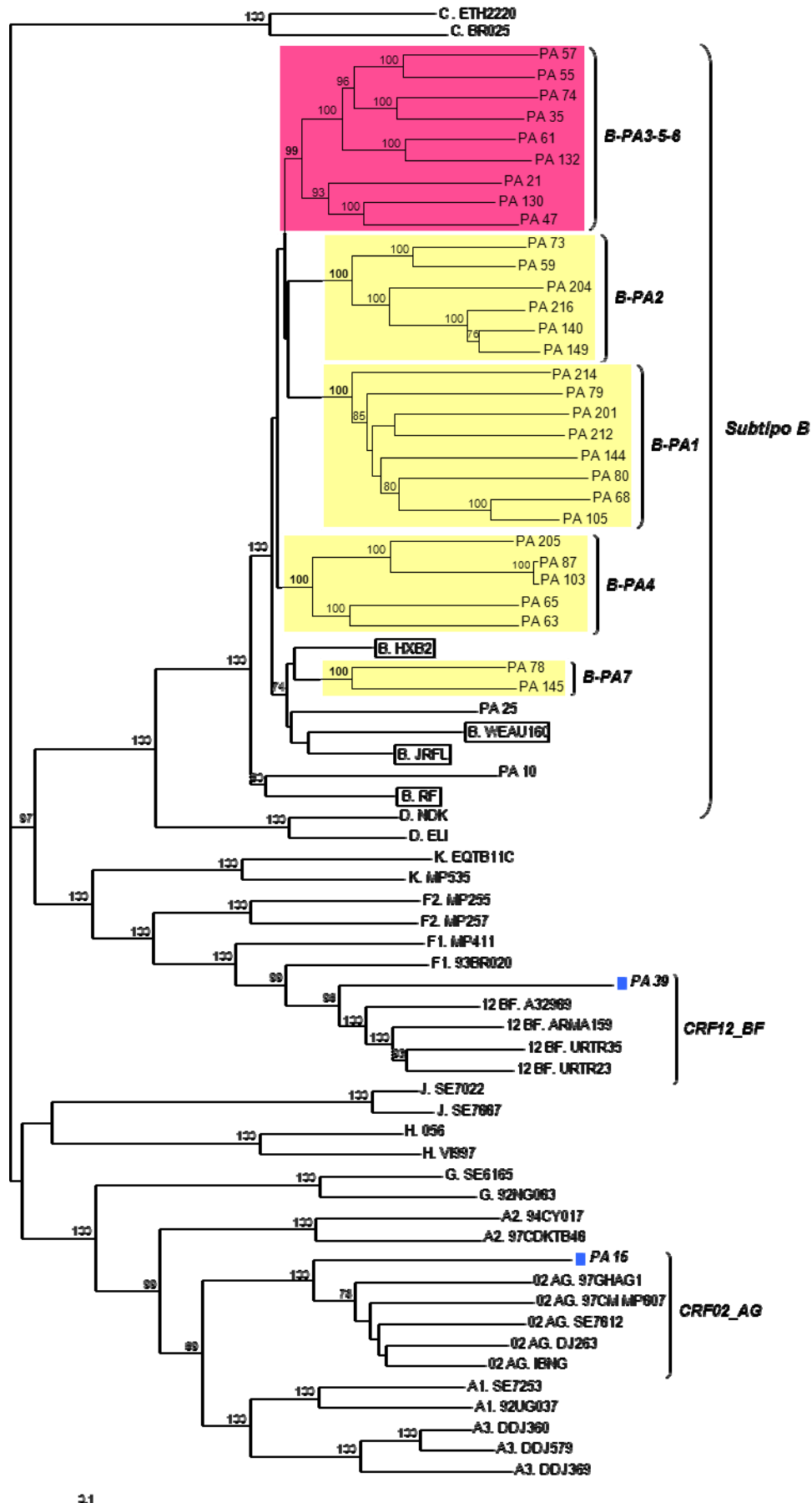
#### 4.3. Análisis filogenético de las secuencias de los genomas completos

Se caracterizaron 36 secuencias de genomas completos de virus de subtipo B de los 7 *clusters* y de los dos virus de formas genéticas no B de Panamá, con el fin de analizar la relación filogenética entre dichos *clusters* y de los mismos con virus de otros países, así como la recombinación intra e intersubtipo.

La topología de los árboles filogenéticos contruidos con genomas completos de subtipo B es en general congruente con la estructura en *clusters* previamente definida en PR-TI, excepto para los *clusters* B-PA3 y B-PA5, que en el árbol de PR-TI forman dos *clusters* separados (Figura 27), pero en el de genoma completo agrupan en un único *cluster* (B-PA3-5), y para tres virus que presentan topologías incongruentes entre los dos árboles (PA\_8, PA\_34 y PA\_203) (Figura 31). En un análisis posterior, al eliminar los virus con topología incongruente, incluyendo la secuencia PA\_8, que ramifica por fuera (en posición basal) del *cluster* B-PA3-5, se pudo establecer que los *clusters* B-PA3-5 y B-PA6, que en el árbol de PR-TI forman tres *clusters* separados agrupan en un único *supercluster* (B-PA3-5-6) en el genoma completo, apoyado por un valor de *bootstrap* del 99% (Figura 32).



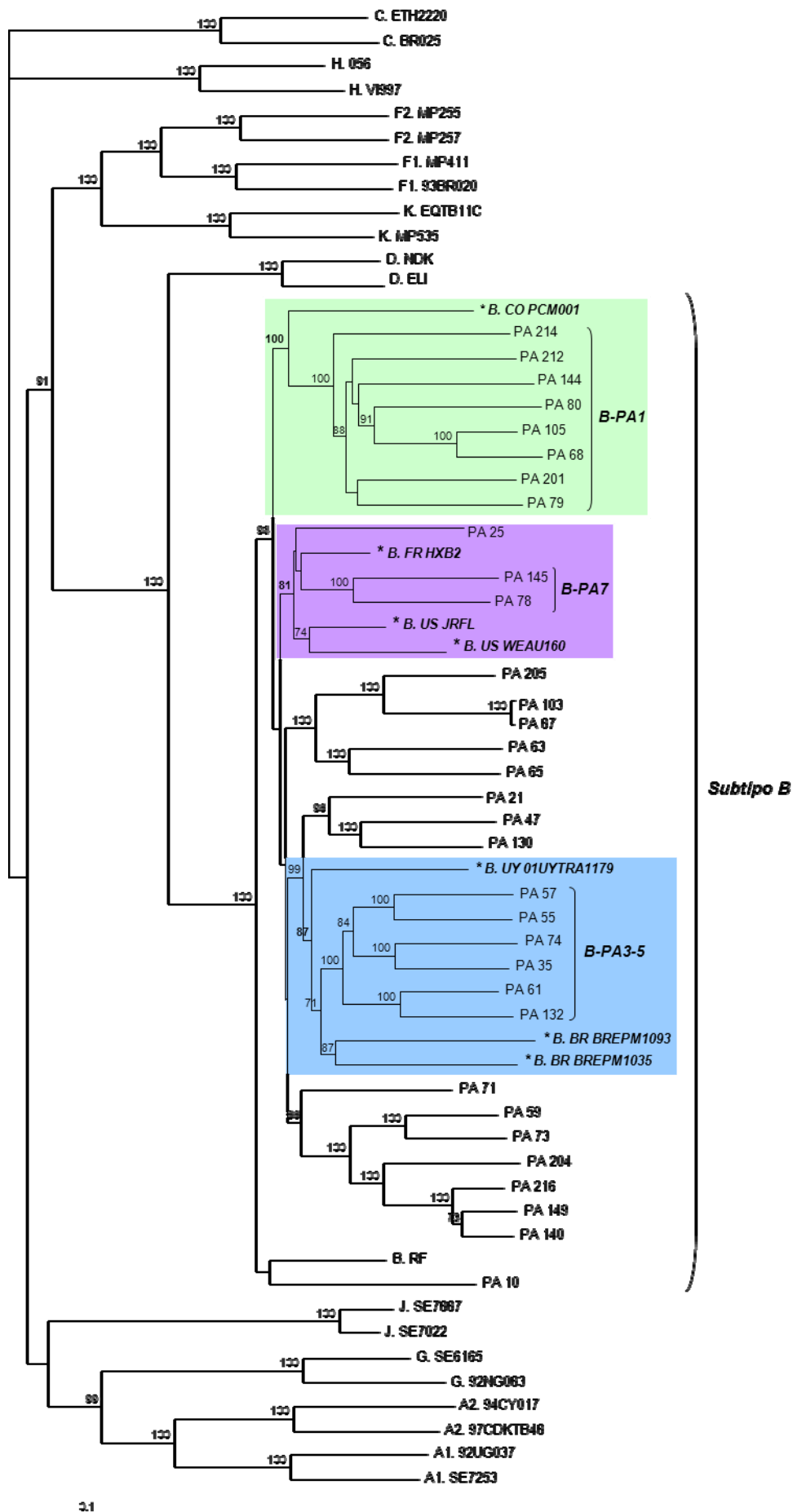
**Figura 31** . Árbol filogenético de máxima verosimilitud de los genomas completos de Panamá. Los nombres de los virus de Panamá empiezan con PA. Los nombres de las referencias del subtipo B están enmarcados. Los nombres de los *clusters* del subtipo B de Panamá corresponden a nombres previamente definidos en PR-TI y están indicados a la derecha de los corchetes correspondientes. El *cluster* B-PA3-5 corresponde a virus que en PR-TI forman dos *clusters* separados, B-PA3 y B-PA-5, pero que en genomas completos forman un único *cluster*. Los nombres de los virus con topología incongruente entre los árboles de PR-TI y el de genomas completos están dentro de rectángulos rojos y sus nombres están en negrita, indicándose entre paréntesis el *cluster* al que pertenecen en PR-TI. Los dos virus de subtipo no B de Panamá están señalados con cuadrados azules y sus nombres están en negrita. Los nombres de los clados de VIH-1 que comprenden virus de Panamá están indicados a la derecha de los corchetes correspondientes. Sólo se muestran valores de *bootstrap*  $\geq 70\%$ .





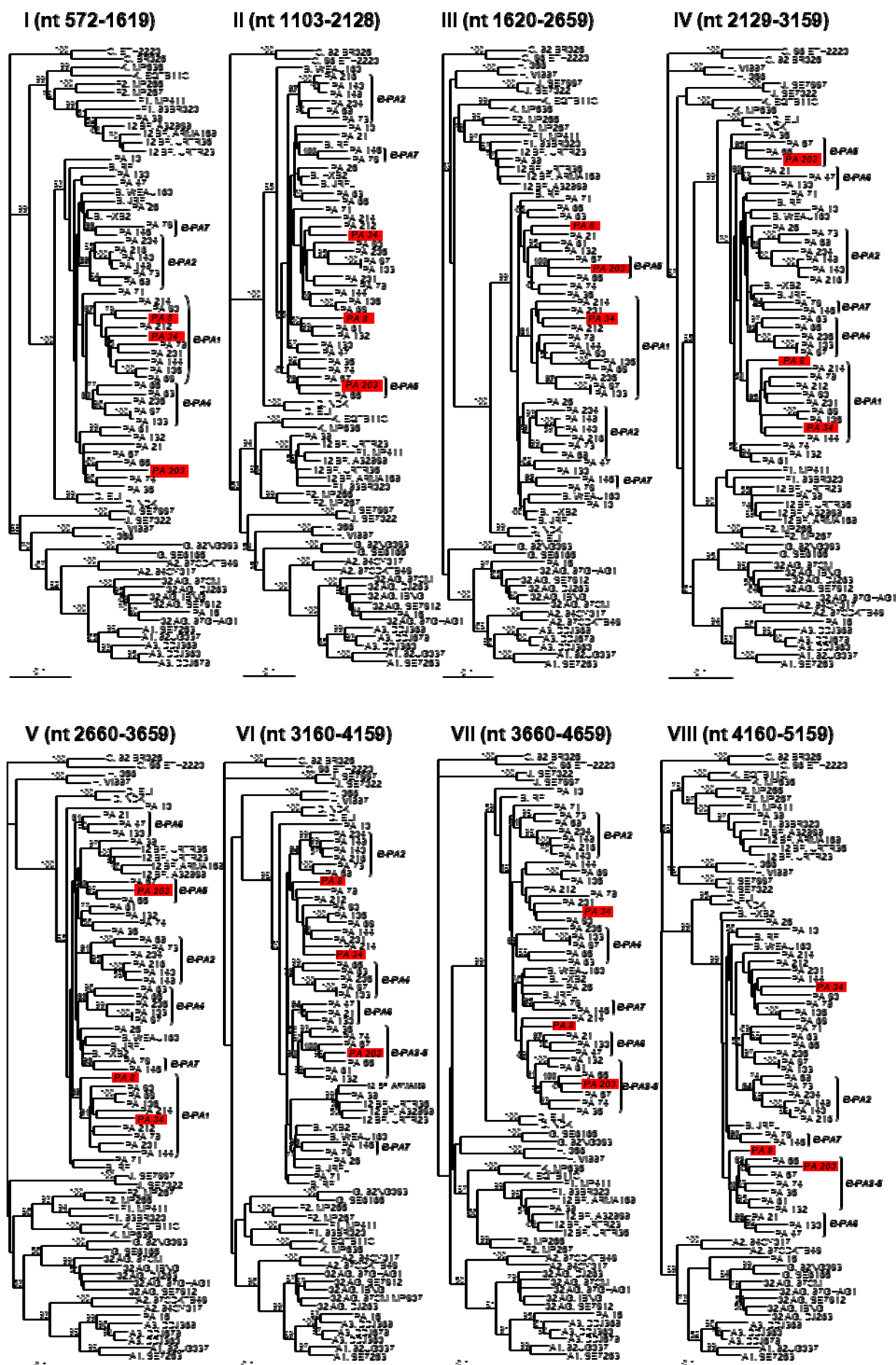
**Figura 32** . Árbol filogenético de máxima verosimilitud de los genomas completos de los *clusters* B-PA3-5 y B-PA6, tras excluir del análisis las secuencias con topología discordante entre los árboles de PR-TI y genomas completos PA\_8 (que ramifica basalmente con respecto al *cluster* B-PA3-5), PA\_34 (que ramifica basalmente con respecto al *cluster* B-PA2), y PA\_203 (agrupa dentro del *cluster* B-PA1). Se observa que el *cluster* B-PA3-5 y B-PA6 que en PR-TI forman tres *clusters* separados, B-PA3, B-PA5 y B-PA6, corresponden a virus que en genomas completos forman un único *supercluster* (B-PA3-5-6). Los nombres de los virus de Panamá empiezan con PA. Los nombres de las referencias del subtipo B están enmarcados. Los nombres de los *clusters* del subtipo B de Panamá están indicados a la derecha de los corchetes correspondientes. El *supercluster* B-PA3-5-6 está dentro del rectángulo rosa. Los dos virus de subtipo no B de Panamá están señalados con cuadrados azules y están en negrita. Los nombres de los clados de VIH-1 que comprenden virus de Panamá están indicados a la derecha de los corchetes correspondientes. Sólo se muestran valores de *bootstrap*  $\geq 70\%$ .

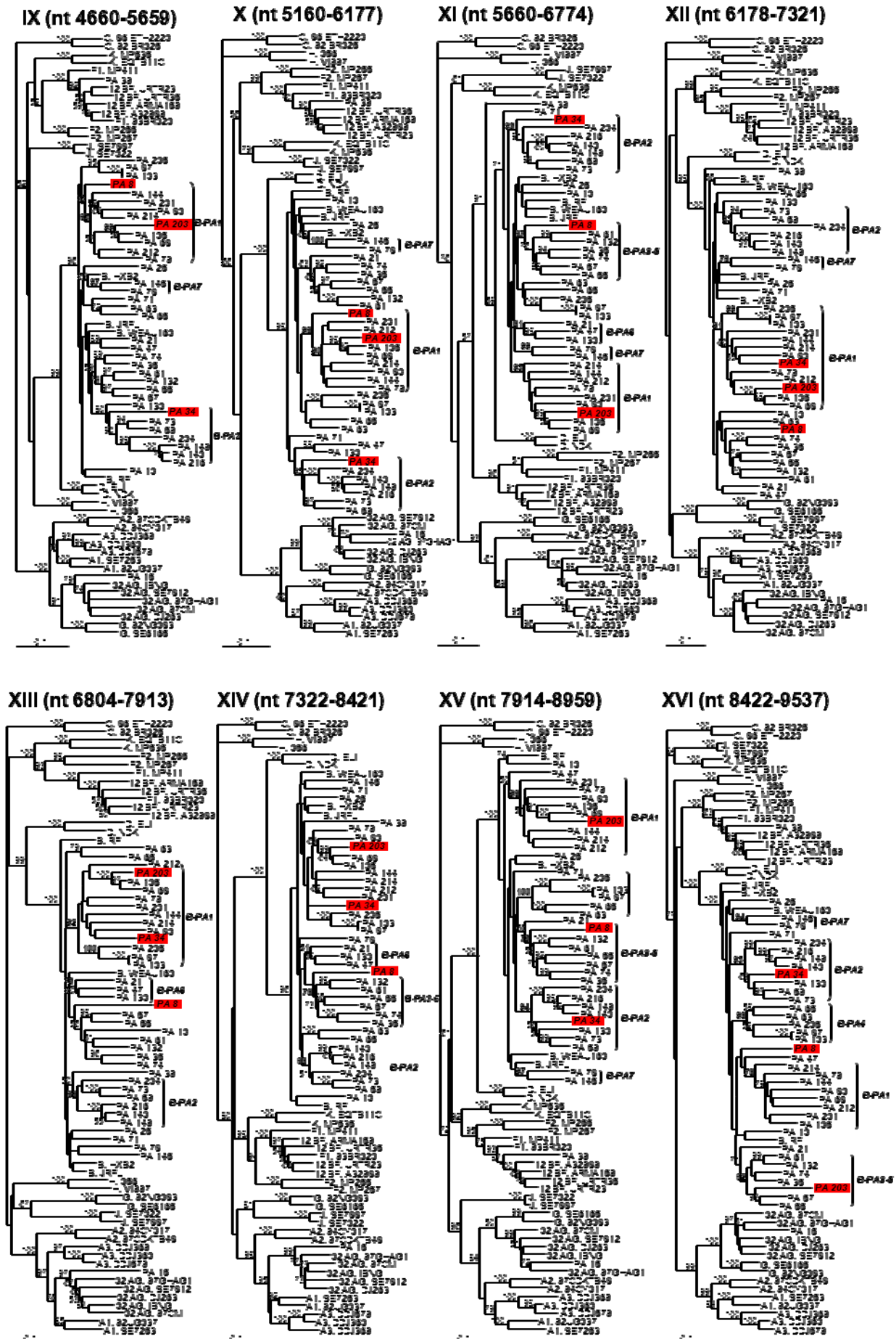
La relación filogenética de los *clusters* de subtipo B de Panamá con virus de otros países se analizó alineando todas las secuencias completas de subtipo B depositadas en la base de datos de Los Alamos (14) con las secuencias de subtipo B de Panamá y construyendo un árbol NJ utilizando el programa MEGA. Aquellas secuencias de la base de datos que agrupaban con alguno de los *clusters* de Panamá con un valor de *bootstrap*  $\geq 70\%$  se seleccionaron para un análisis filogenético posterior con el método ML utilizando RAxML aplicando el modelo evolutivo GTR+CAT+I. Este análisis permitió establecer que varios de los *clusters* de Panamá estaban relacionados filogenéticamente con virus de otros países: **1)** el *cluster* B-PA3-5 agrupa con tres virus de Sudamérica, dos de ellos de Brasil y el tercero de Uruguay, con un valor de *bootstrap* del 87%; **2)** el *cluster* B-PA1, que comprende el 32,1% de los virus del subtipo B de Panamá en PR-TI, agrupa con un virus de Colombia con un valor de *bootstrap* del 100%; y **3)** el *cluster* B-PA7 está relacionado con dos virus de Estados Unidos y uno de Francia con un valor de *bootstrap* del 81% (Figura 33).



**Figura 33.** Árbol filogenético de máxima verosimilitud de genomas completos de Panamá, que revela la relación filogenética entre *clusters* de subtipo B de Panamá y virus de otros países. Los nombres de los virus de Panamá empiezan con PA. Los nombres de los virus del subtipo B relacionados con los *clusters* de Panamá están marcados con un asterisco y están en negrita, indicándose el código de dos letras del país en el que se recogió la muestra. Los nombres de los *clusters* de subtipo B de Panamá están indicados a la derecha de los corchetes correspondientes. Los *clusters* que comprenden *clusters* de Panamá y virus de otros países se señalan con rectángulos de diferentes colores. Sólo se muestran valores de *bootstrap*  $\geq 70\%$ .

Con el fin de examinar la presencia de recombinación intrasubtipo en los virus de subtipo B, se dividió el genoma viral en fragmentos de 1 kb, con un solapamiento de 500 nt entre segmentos consecutivos, analizándose cada segmento mediante máxima verosimilitud. Los resultados de este análisis muestran que los tres virus con topología discordante entre los árboles de PR-TI y de genomas completos, PA\_8, PA\_34 y PA\_203 (Figura 31), presentan topologías incongruentes entre distintos segmentos del genoma (Figura 34). Así vemos que, considerando solamente los *clusters* apoyados con valores de *bootstrap*  $\geq 70\%$ , PA\_8 agrupa en el *cluster* B-PA1 en el segmento X y en el *cluster* B-PA3-5 en el segmento XV; PA\_34 agrupa en el *cluster* B-PA1 en los segmentos III a V y XII a XIII, y en el *cluster* B-PA2 en los segmentos IX a XI y XV a XVI; y PA\_203 agrupa en el *cluster* B-PA1 en los segmentos X a XIII y XV, en el *cluster* B-PA5 en los segmentos II a V (en estos segmentos los virus del *cluster* B-PA-5 agrupan separadamente de los virus clasificados en PR-TI en el *cluster* B-PA3), y en el *cluster* B-PA3-5 en los segmentos VI a VII (Tabla 14). Este análisis por lo tanto indica que PA\_8, PA\_34 y PA\_203 son virus recombinantes intrasubtipo B, generados mediante recombinación de virus pertenecientes a los clusters B-PA1 y B-PA3-5 (PA\_8), B-PA1 y B-PA2 (PA\_34), y B-PA1 y B-PA3-5 (PA\_203), respectivamente.





**Figura 34** . Árboles filogenéticos de máxima verosimilitud de segmentos solapantes consecutivos de los genomas completos de Panamá. Los nombres de los virus de Panamá empiezan con PA. Los nombres de los virus con topología discordante entre PR-TI y genomas completos están dentro de rectángulos rojos y están en negrita. En la parte superior de cada árbol se indica las posiciones en el virus de referencia HXB2 que delimitan los segmentos analizados. Sólo se muestran valores de *bootstrap*  $\geq 50\%$ .



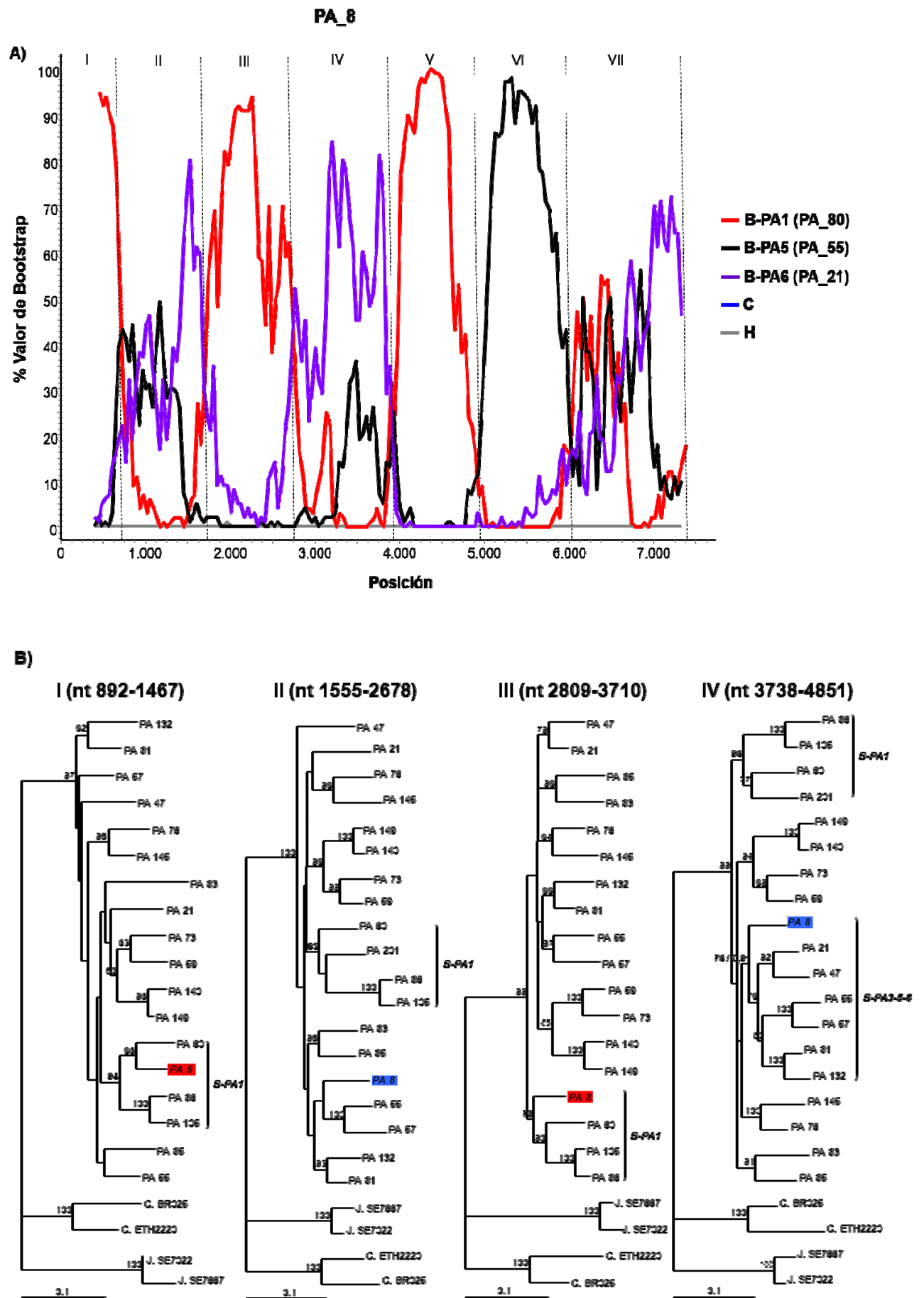
**Tabla 14.** Análisis filogenético de fragmentos solapantes de 3 virus de subtipo B con topología incongruente entre PR-TI y genoma completo: agrupamiento con *clusters* de Panamá a lo largo del genoma.

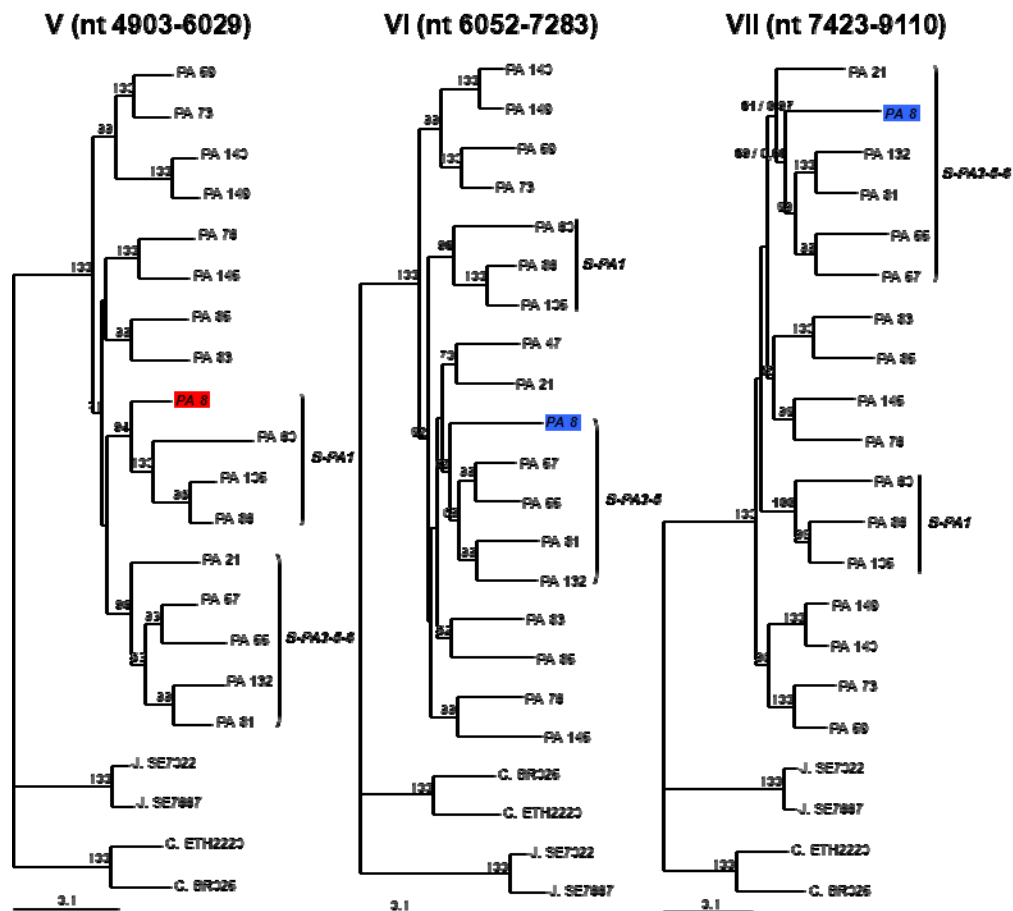
Segmentos*	Posición en HXB2	Muestras		
		PA_8	PA_34	PA_203
I	572-1619			
II	1103-2128			B-PA5
III	1620-2659		B-PA1	B-PA5
IV	2129-3159		B-PA1	B-PA5
V	2660-3659		B-PA1	B-PA5
VI	3160-4159			B-PA3-5
VII	3660-4659			B-PA3-5
VIII	4160-5159			
IX	4660-5659		B-PA2	
X	5160-6177	B-PA1	B-PA2	B-PA1
XI	5660-6774		B-PA2	B-PA1
XII	6178-7321		B-PA1	B-PA1
XIII	6804-7913		B-PA1	B-PA1
XIV	7322-8421			
XV	7914-8959	B-PA3-5	B-PA2	B-PA1
XVI	8422-9537		B-PA2	

\*El genoma viral fue dividido en fragmentos de 1 Kb, con solapamiento de 500 nt entre segmentos consecutivos. Se indican los segmentos en los que el genoma de cada virus agrupa con referencias de los distintos *clusters* de Panamá con valor de *bootstrap*  $\geq 70\%$ , de acuerdo con los análisis de ML utilizando el programa RAxML. Las celdas vacías indican que en el fragmento correspondiente no hay agrupamiento con ningún *cluster* que esté apoyado por el valor de *bootstrap* mencionado.

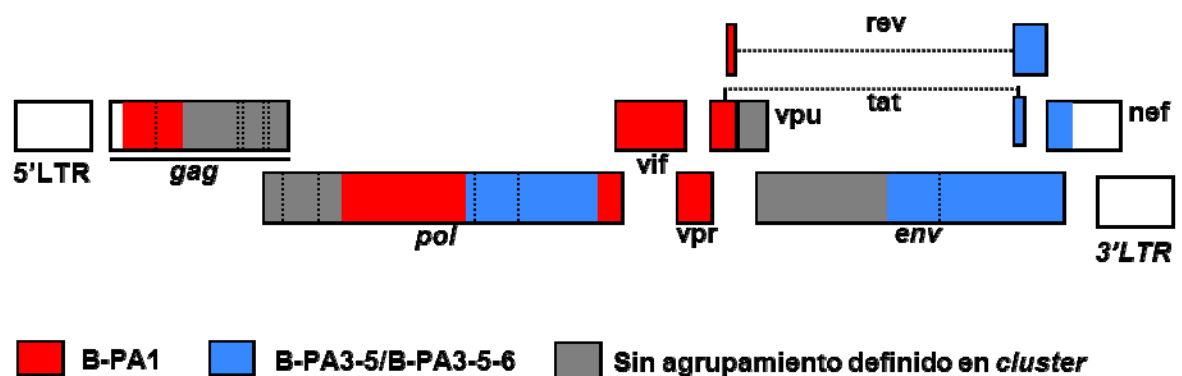
Para determinar con mayor precisión la localización de los puntos de rotura, se realizó análisis mediante *bootscanning* utilizando el programa Simplot, con una ventana de 800 nt, desplazándose en incrementos de 40 nt, con construcción de árboles filogenéticos mediante el algoritmo NJ, utilizando como referencias de los *clusters* de Panamá virus que presentan topología congruente a lo largo de todo el genoma. Posteriormente al análisis mediante Simplot, se construyeron árboles filogenéticos de segmentos parciales mediante ML con el programa RAxML, utilizando como puntos de corte entre los segmentos analizados los correspondientes a fragmentos que agrupan con distintas referencias de *clusters* del subtipo B de Panamá. Dicho análisis permitió determinar la estructura recombinante intrasubtipo de los genomas, aunque varios fragmentos de los genomas quedaron sin asignar a ningún *cluster* debido a bajos valores de *bootstrap* (Figuras 35-37).

Los virus de formas genéticas no B PA\_15 y PA\_39 también se analizaron mediante *bootscanning* utilizando el programa Simplot, con una ventana de 400 nt, desplazándose en incrementos de 40 nt, con construcción de árboles filogenéticos mediante el algoritmo NJ, utilizando como referencias virus de subsubtipo A3 y CRF02\_AG; y subtipo B y CRF12\_BF, respectivamente. Posteriormente se construyeron árboles filogenéticos de segmentos parciales utilizando el programa RAxML, utilizando como puntos de corte entre los segmentos analizados los correspondientes al cambio en la topología obtenidos mediante Simplot. Los resultados permitieron determinar la estructura en mosaico de los genomas de estos recombinantes intersubtipo (Figuras 38-39). De acuerdo con estos análisis, el genoma de PA\_15 deriva en la mayor parte del genoma de la CRF02\_AG, derivando del subsubtipo A3 la mayor parte de *pol*, excepto el extremo 5', y un segmento de unos 200 nt del extremo 5' de *vif*. Con respecto a PA\_39, su genoma deriva predominantemente de la CRF12\_BF, derivando de subtipo B un segmento de unos 200 nt del extremo 5' de la TI, la mayor parte de *vpu*, excepto el extremo 5' y la gp120 y el extremo 5' de la gp41.

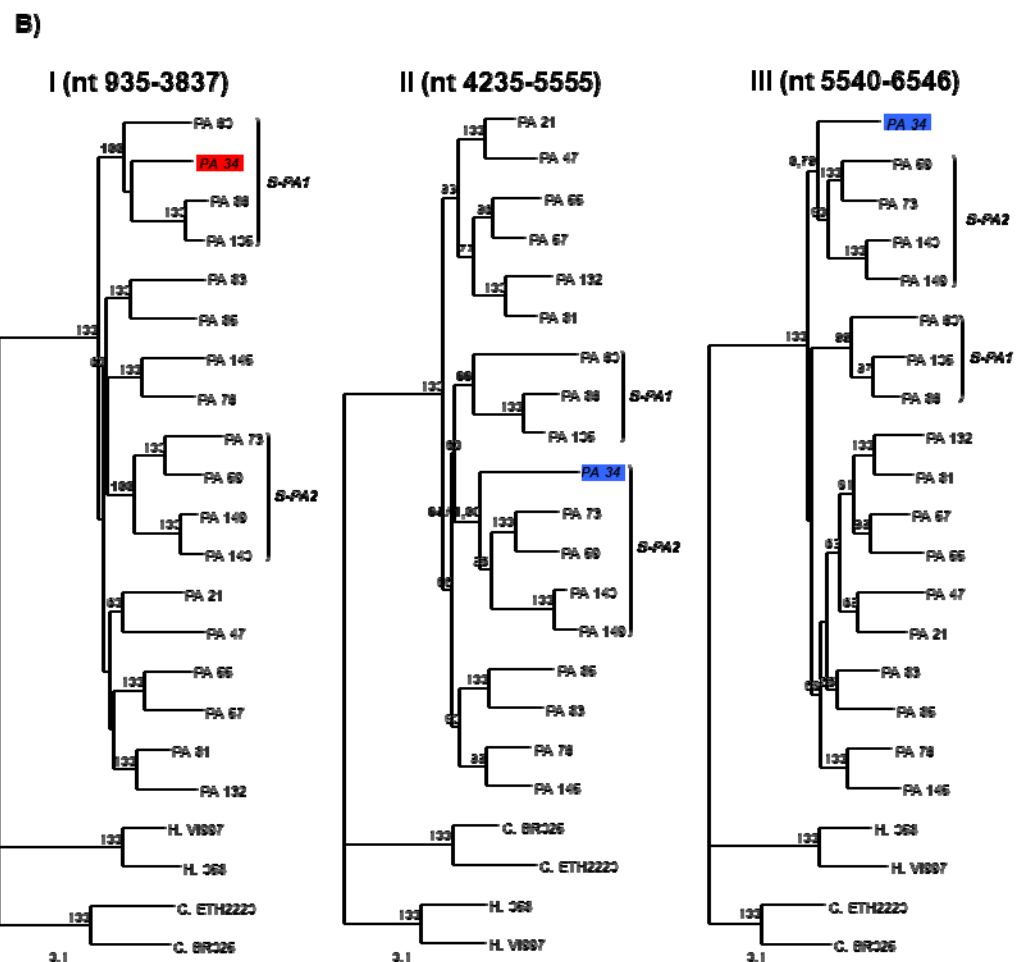
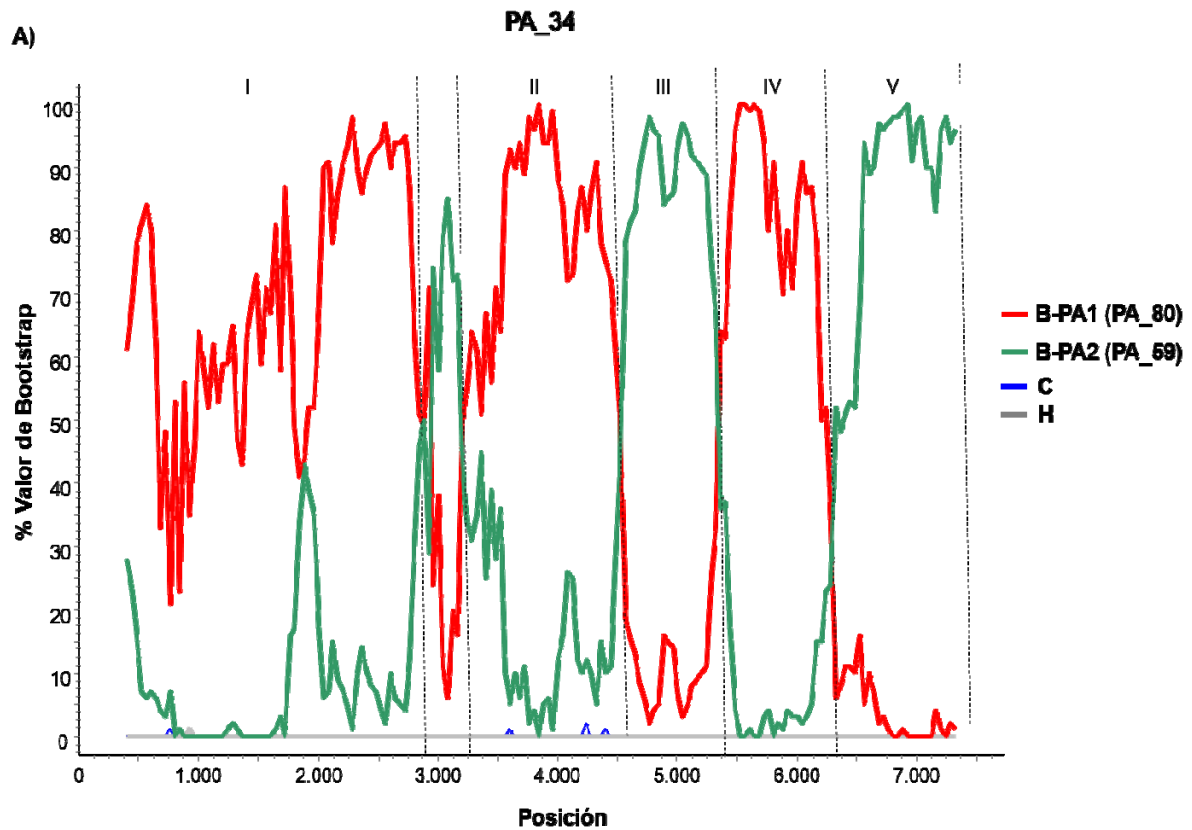


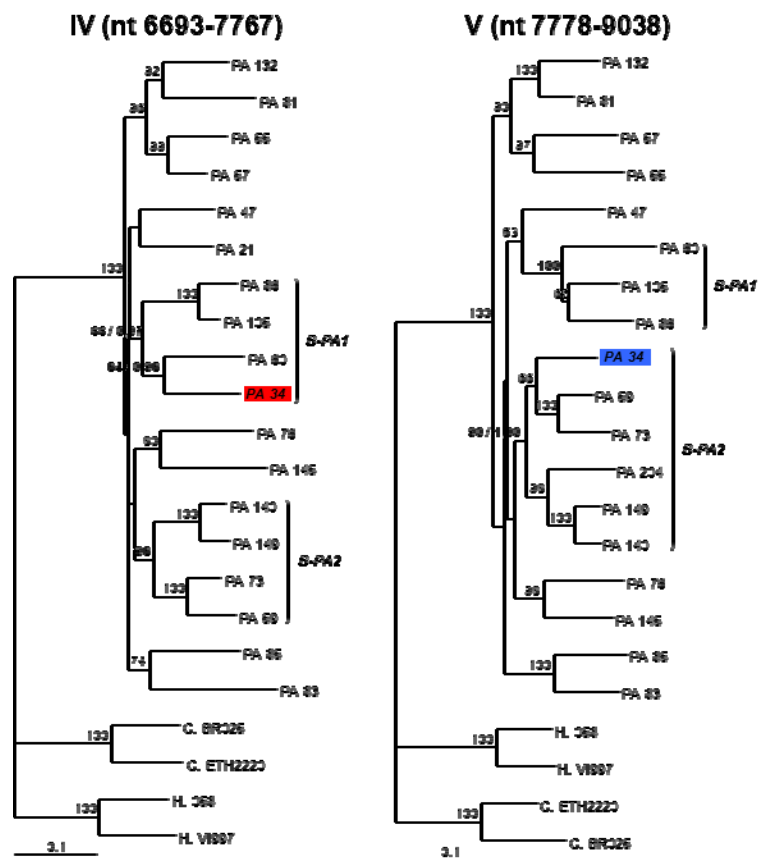


c)

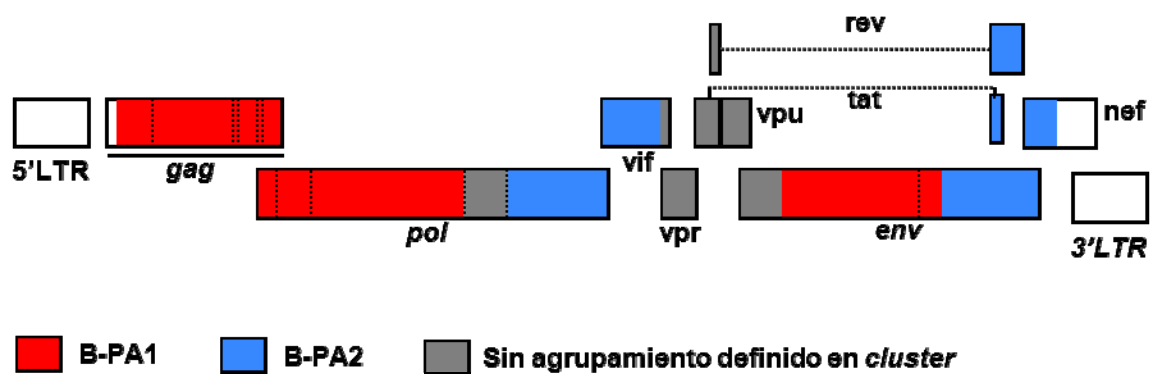


**Figura 35.** Análisis de la estructura en mosaico del genoma completo de PA\_8. **(A)** Análisis mediante *bootscanning* utilizando el programa Simplot. Se utilizó una ventana de 800 nt desplazándose en incrementos de 40 nt. En el análisis inicial se utilizaron secuencias de todos los *clusters* del subtipo B de Panamá como referencias; en un análisis posterior (que se muestra en la figura) se utilizaron solamente secuencias de los *clusters* (B-PA1, B-PA5 y B-PA6), que agrupaban con PA\_8 con un valor de *bootstrap*  $\geq 70\%$  en alguno de los segmentos en el análisis inicial, además de los subtipos C y H como grupos externos. La numeración en el eje horizontal corresponde a la de la secuencia analizada, de la que se han eliminado los segmentos altamente polimórficos con alineamiento incierto. **(B)** Árboles filogenéticos de máxima verosimilitud de segmentos parciales del genoma, correspondientes a fragmentos que agrupan con distintas referencias de *clusters* del subtipo B de Panamá en el análisis mediante Simplot. Se utilizaron secuencias de todos los *clusters* para identificar las secuencias parentales. Los segmentos se analizaron también mediante el método bayesiano con MrBayes, indicándose la PP de los nodos correspondientes a los *clusters* que incluyen PA\_8 a la derecha del valor de *bootstrap* (solamente se muestran los valores de PP  $\geq 0,85$ ). En la parte superior de cada árbol se indica las posiciones en el virus de referencia HXB2 que delimitan los segmentos analizados. **(C)** Patrón de recombinación intrasubtipo de la secuencia del genoma completo de PA\_8 inferido a partir de los resultados de los análisis mostrados en (A) y (B).



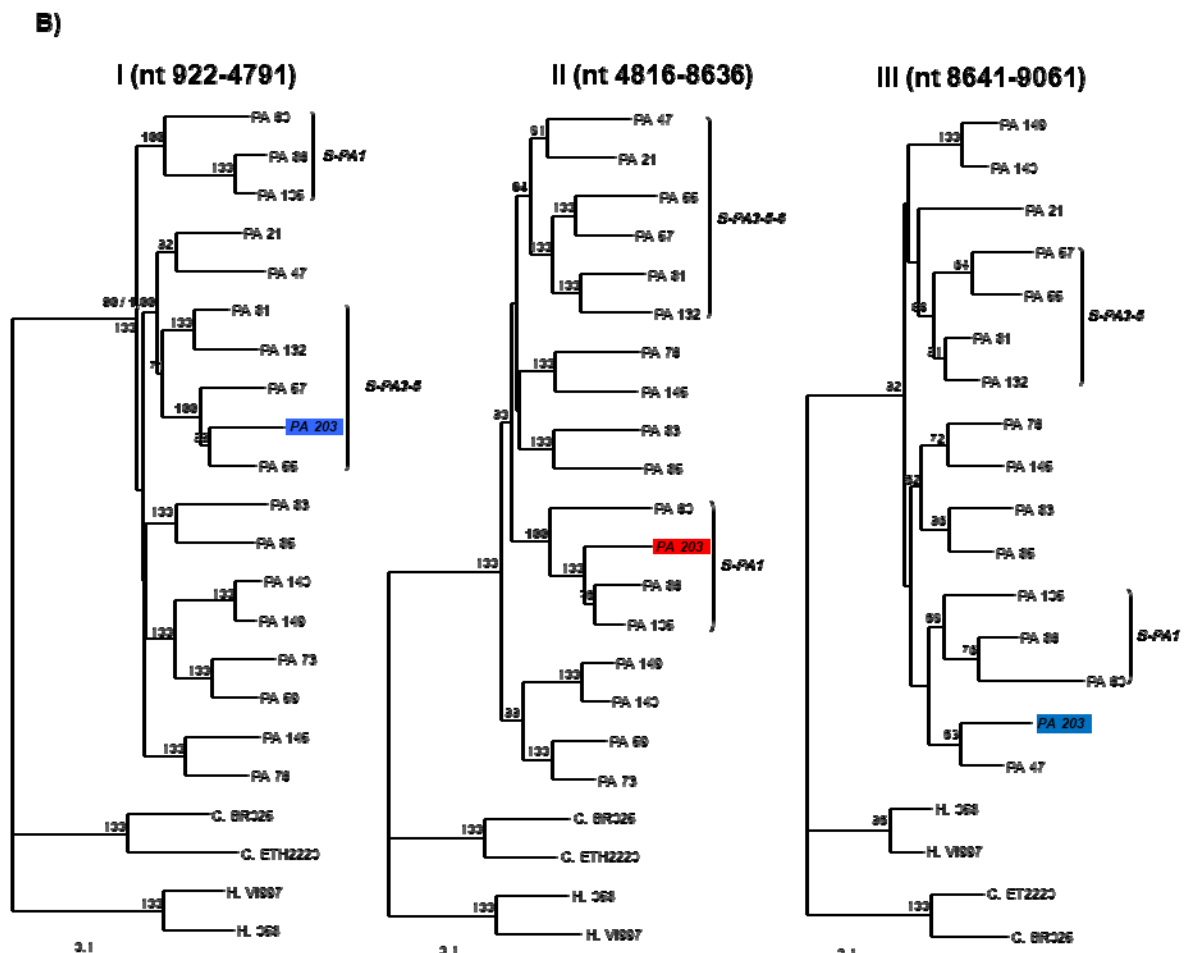
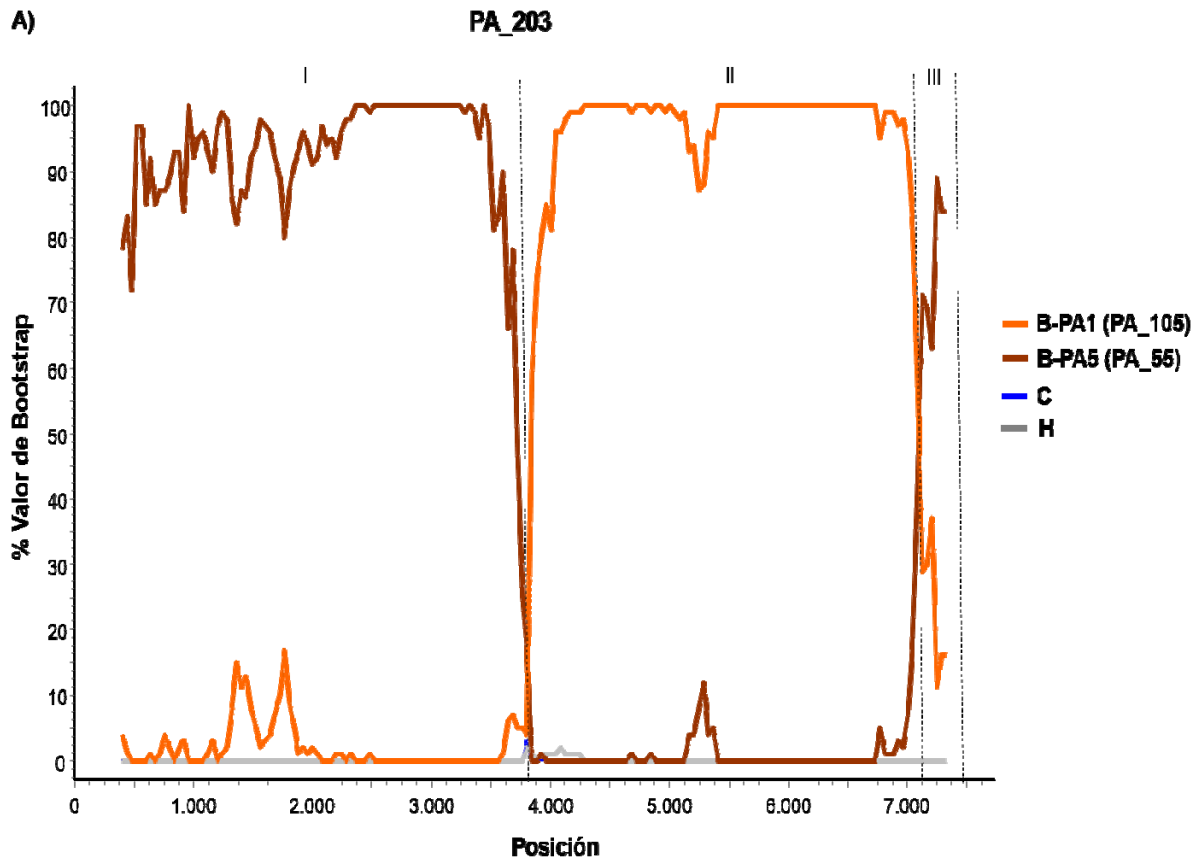


c)

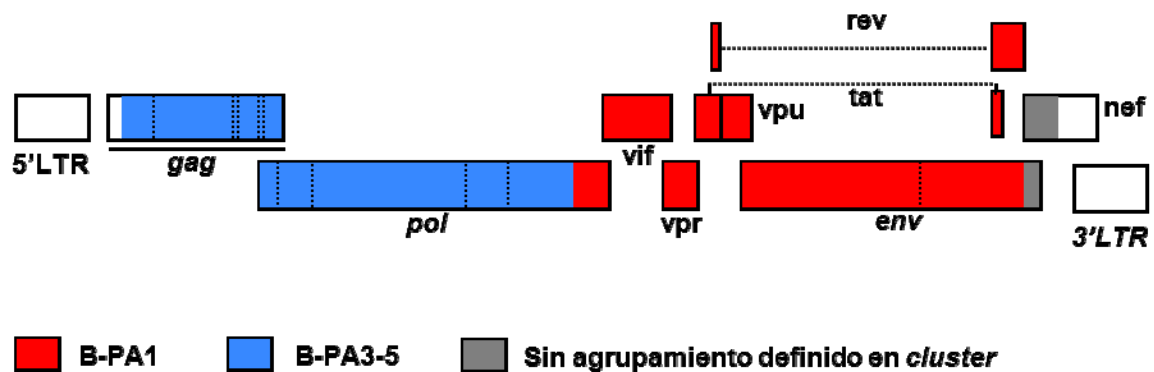


**Figura 36.** Análisis de la estructura en mosaico del genoma completo de PA\_34. **(A)** Análisis mediante *bootscanning* utilizando el programa Simplot. Se utilizó una ventana de 800 nt desplazándose en incrementos de 40 nt. En el análisis inicial se utilizaron secuencias de todos los *clusters* del subtipo B de Panamá como referencias; en un análisis posterior (que se muestra en la figura) se utilizaron solamente secuencias de los *clusters* (B-PA1 y B-PA2), que agrupaban con PA\_34 con un valor de *bootstrap*  $\geq 70\%$  en alguno de los segmentos en el análisis inicial, además de los subtipos C y H como grupos externos. El eje horizontal corresponde al genoma analizado, del que se han eliminado los segmentos altamente polimórficos con alineamiento incierto. **(B)** Árboles filogenéticos de máxima verosimilitud de segmentos parciales del genoma, correspondientes a fragmentos que agrupan con distintas referencias de *clusters* del subtipo B de Panamá en el análisis mediante Simplot. Se utilizaron secuencias de todos los *clusters* para identificar las secuencias parentales. Los análisis se realizaron también con el método bayesiano utilizando MrBayes, indicándose la PP de los nodos correspondientes a los *clusters* que incluyen PA\_34 a la derecha del valor de *bootstrap* (solamente se muestran los valores de PP  $\geq 0,85$ ). En la parte superior de cada árbol se indica las posiciones en el virus de referencia HXB2 que delimitan los segmentos analizados. **(C)** Patrón de recombinación intrasubtipo de la secuencia del genoma completo de PA\_34 inferido a partir de los resultados de los análisis mostrados en (A) y (B).

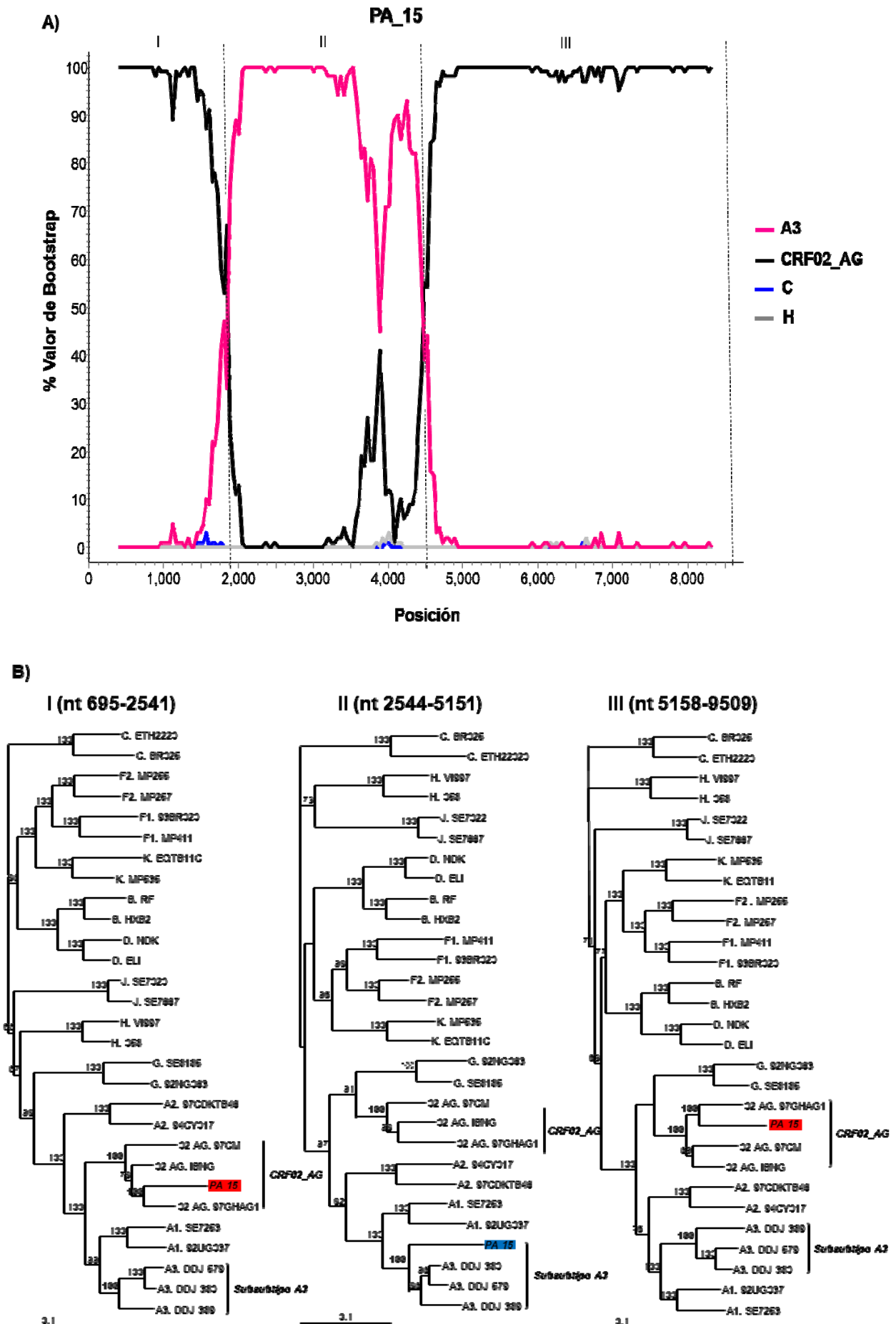




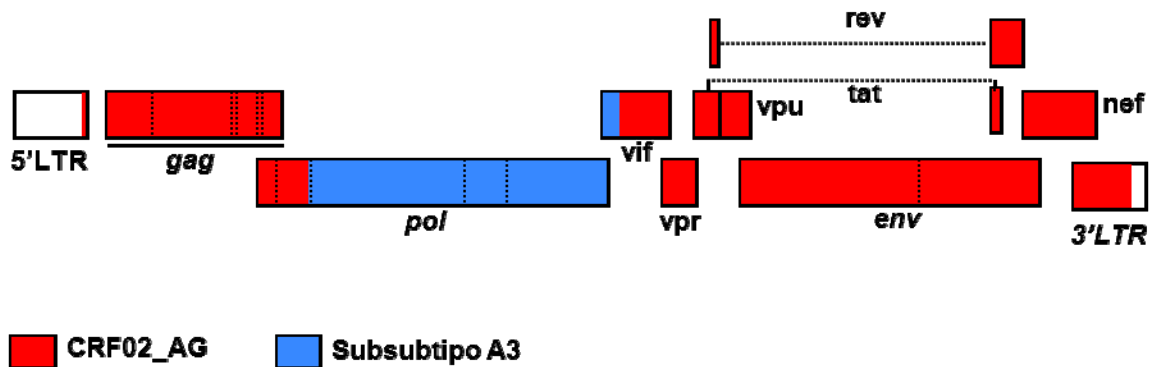
c)



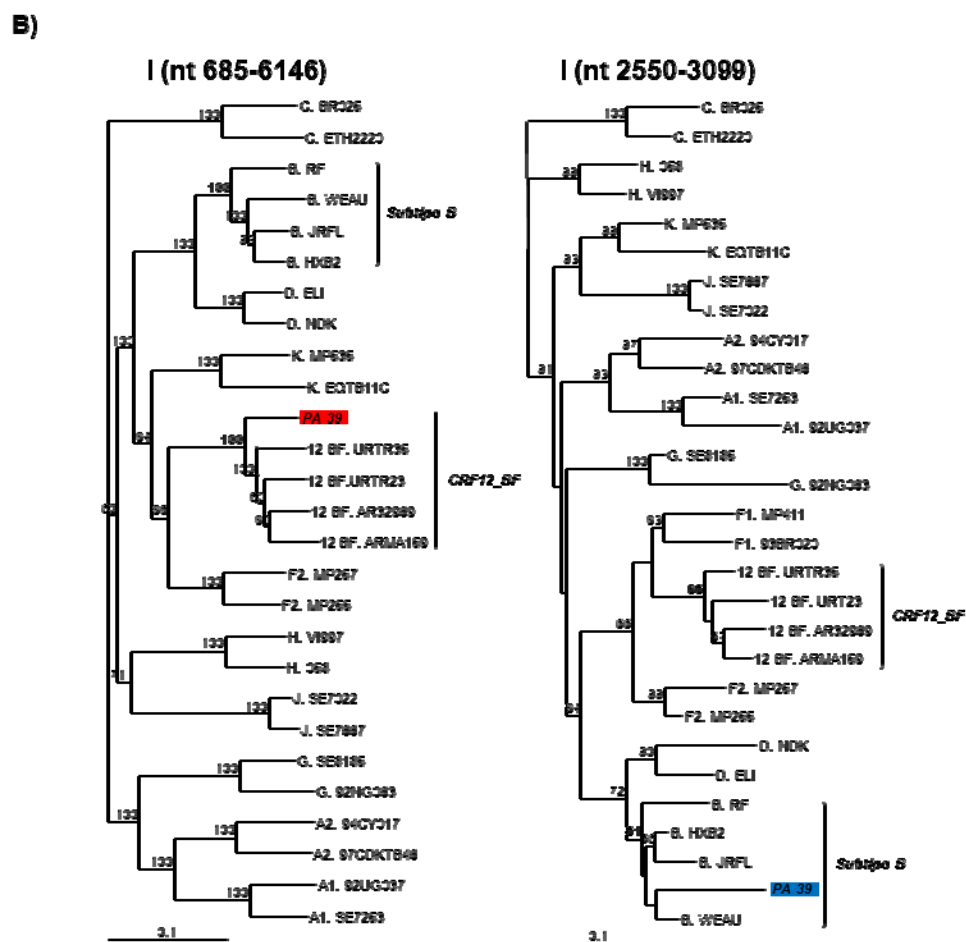
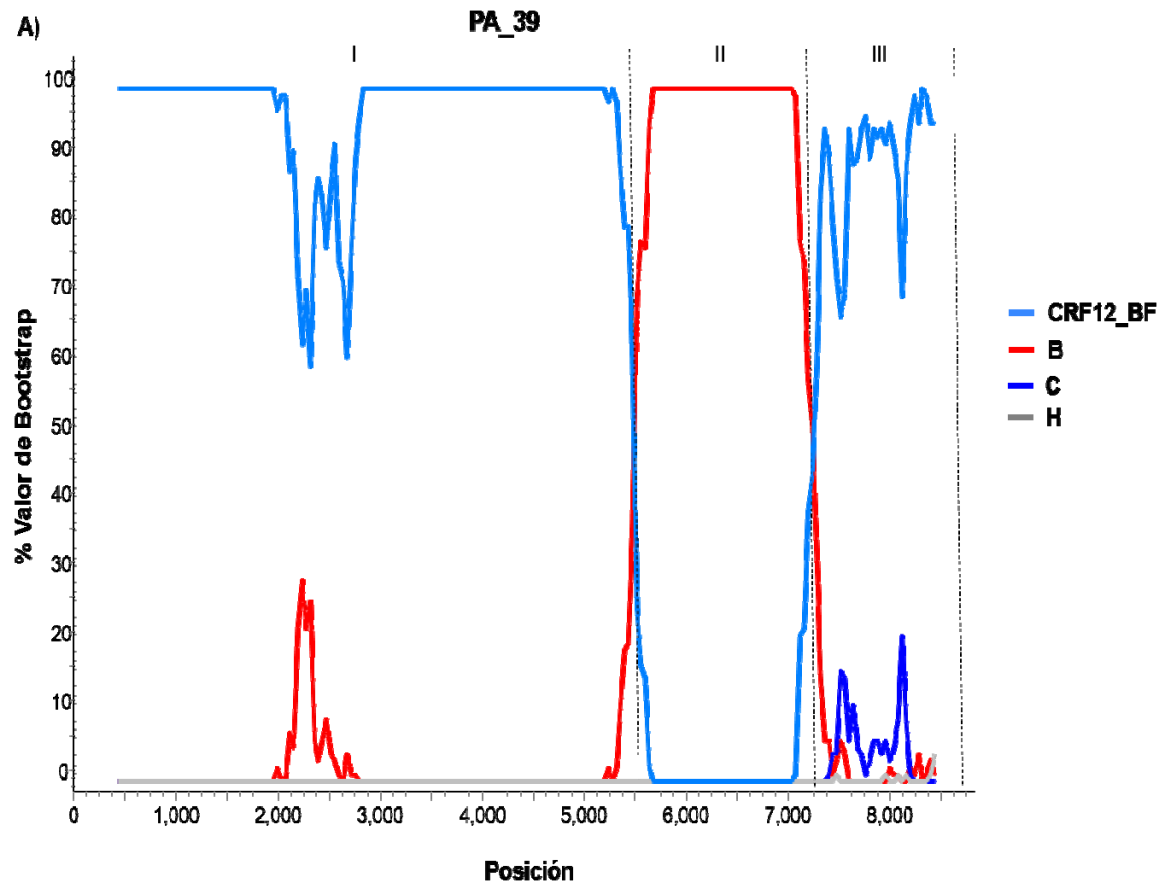
**Figura 37.** Análisis de la estructura en mosaico del genoma completo de PA\_203. **(A)** Análisis mediante *bootscanning* utilizando el programa Simplot. Se utilizó una ventana de 800 nt desplazándose en incrementos de 40 nt. En el análisis inicial se utilizaron secuencias de todos los *clusters* del subtipo B de Panamá como referencias; en un análisis posterior (que se muestra en la figura) se utilizaron solamente secuencias de los *clusters* (B-PA1 y B-PA5), que agrupaban con PA\_203 con un valor de *bootstrap*  $\geq 70\%$  en alguno de los segmentos en el análisis inicial, además de los subtipos C y H como grupos externos. El eje horizontal corresponde al genoma analizado, del que se han eliminado los segmentos altamente polimórficos con alineamiento incierto. **(B)** Árboles filogenéticos de máxima verosimilitud de segmentos parciales del genoma, correspondientes a fragmentos que agrupan con distintas referencias de *clusters* del subtipo B de Panamá en el análisis mediante Simplot. Se utilizaron secuencias de todos los *clusters* para identificar las secuencias parentales. Los segmentos se analizaron también mediante el método bayesiano con MrBayes, indicándose la PP de los nodos correspondientes a los *clusters* que incluyen PA\_203 a la derecha del valor de *bootstrap* (solamente se muestran los valores de PP  $\geq 0,85$ ). En la parte superior de cada árbol se indica las posiciones en el virus de referencia HXB2 que delimitan los segmentos analizados. **(C)** Patrón de recombinación intrasubtipo de la secuencia del genoma completo de PA\_203 inferido a partir de los resultados de los análisis mostrados en (A) y (B).

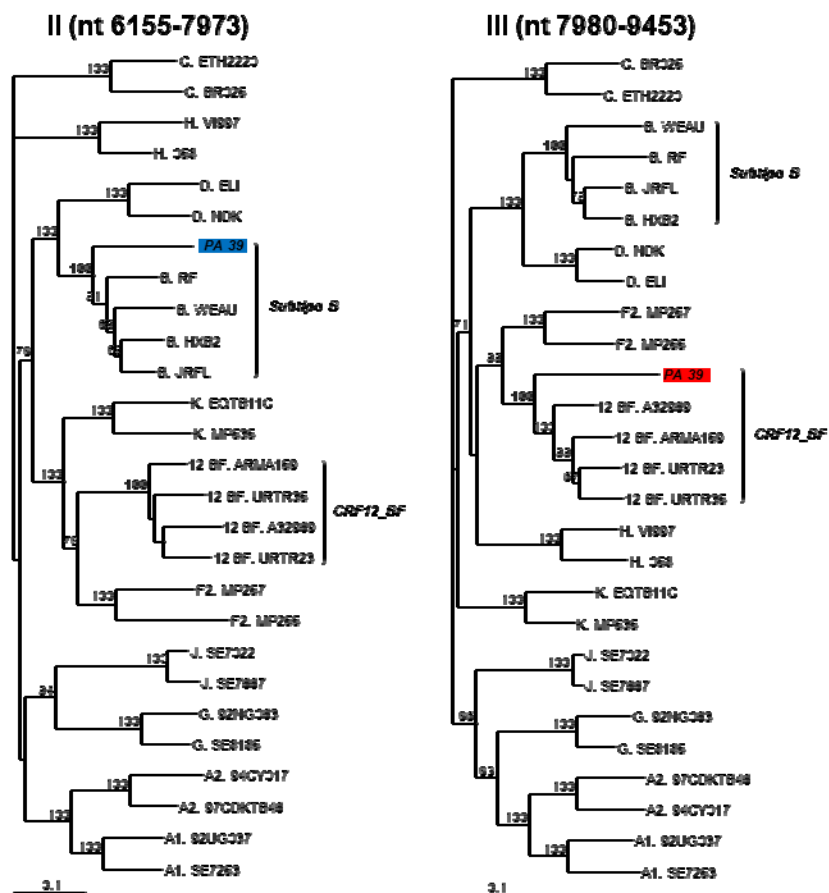


c)

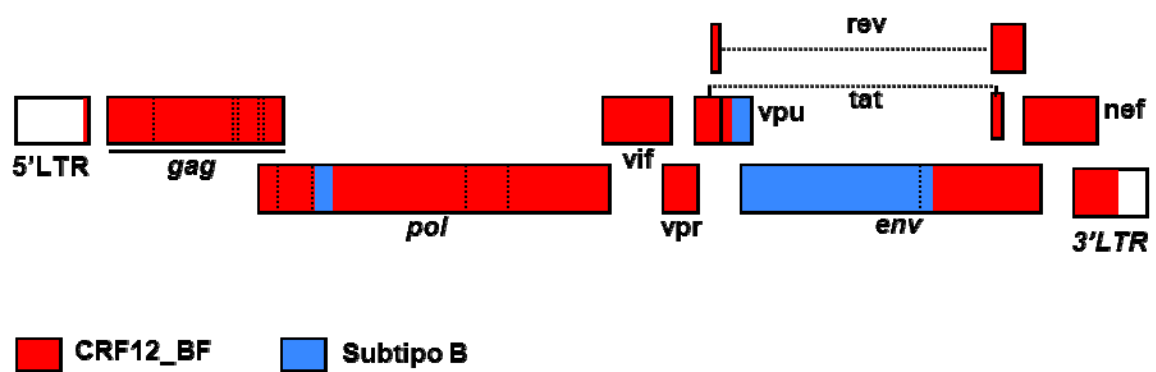


**Figura 38.** Análisis de la estructura en mosaico del genoma completo del virus de subtipo no B PA\_15. **(A)** Análisis mediante *bootscanning* utilizando el programa Simplot. Se utilizó una ventana de 400 nt desplazándose en incrementos de 40 nt. En el análisis inicial se utilizaron secuencias de todos los subtipos, además de CRF02\_AG y subsubtipo A3 como referencias; en un análisis posterior (que se muestra en la figura) se utilizaron solamente referencias de A3 y CRF02\_AG, que agrupaban con PA\_15 con un valor de *bootstrap*  $\geq 70\%$  en alguno de los segmentos en el análisis inicial, además de las de los subtipos C y H como grupos externos. **(B)** Árboles filogenéticos de máxima verosimilitud de segmentos parciales del genoma, delimitados por los puntos en los que cambia la topología en el análisis mediante Simplot. En la parte superior de cada árbol se indica las posiciones en el virus de referencia HXB2 que delimitan los segmentos analizados. **(C)** Patrón de recombinación intersubtipo de la secuencia del genoma completo de PA\_15 inferido a partir de los resultados de los análisis mostrados en (A) y (B).





c)



**Figura 39.** Análisis de la estructura en mosaico del genoma completo del virus de subtipo no B PA\_39. **(A)** Análisis mediante *bootscanning* utilizando el programa Simplot. Se utilizó una ventana de 400 nt desplazándose en incrementos de 40 nt. En el análisis inicial se utilizaron secuencias de todos los subtipos y de la CRF12\_BF como referencias; en un análisis posterior (que se muestra en la figura) se utilizaron solamente las referencias de subtipo B y CRF12\_BF, que agrupaban con PA\_39 con un valor de *bootstrap*  $\geq 70\%$  en alguno de los segmentos en el análisis inicial, además de las de los subtipos C y H como grupos externos. El análisis mediante *bootscanning* utilizando una ventana de 300 nt en PR-TI detectó un fragmento de 200 nt hacia el extremo 5' de la TI que agrupa con subtipo B (Figura 30B). **(B)** Árboles filogenéticos de máxima verosimilitud de segmentos parciales del genoma, delimitados por los puntos en los que cambia la topología en el análisis mediante Simplot. En la parte superior de cada árbol se indica las posiciones en el virus de referencia HXB2 que delimitan los segmentos analizados. **(C)** Patrón de recombinación intersubtipo de la secuencia del genoma completo de PA\_39 inferido a partir de los resultados de los análisis mostrados en (A) y (B).

#### **4.4. Análisis de resistencia a medicamentos antiretrovirales**

Se detectaron mutaciones que confieren un nivel alto o intermedio de resistencia a medicamentos antirretrovirales (de acuerdo con el programa HIVdb de la Universidad de Stanford) en 8 (6%) de 134 individuos analizados en PR-TI, todos los cuales eran pacientes con SIDA con exposición previa a fármacos antirretrovirales. La distribución de las mutaciones asociadas a resistencia a diferentes clases de fármacos fue la siguiente: un paciente (0,75%) con resistencia a IP, tres (2,2%) a ITINN, dos (1,5%) a IP + ITIAN, uno (0,75%) a ITIAN + ITINN, y uno (0,75%) con resistencias a las tres clases de medicamentos. Las mutaciones de resistencia detectadas en estos 8 pacientes con SIDA fueron consistentes con los respectivos regímenes terapéuticos conocidos, excepto para dos pacientes (PA\_23 y PA\_59). No se detectaron mutaciones asociadas a resistencia en individuos asintomáticos sin tratamiento ARV previo. La lista de las mutaciones asociadas a resistencia a medicamentos ARV se presenta en la Tabla 15.



**Tabla 15.** Mutaciones primarias asociadas a resistencia frente a medicamentos ARV en pacientes infectados por VIH-1 de Panamá.

Paciente	Tratamiento ARV y año de comienzo	<u>Mutaciones de resistencia a ARV*</u>		
		ITIAN	ITINN	IP
PA_10	AZT/3TC 1998 d4T/ddI/NFV 2000 AZT/3TC/EFV 2004	T215F		D30N N88D
PA_14	AZT/3TC/EFV 2004	M184V	K103N	
PA_23	AZT/3TC/IDV 2000 d4T/3TC/NFV 2000	L74V T215Y	L100I K103N	D30N V82A N88D L90M
PA_39	AZT/3TC 2004			L90M
PA_47	AZT/3TC 1998 d4T/ddI/NFV 1999	L74V T215Y		D30N N88D
PA_59	AZT/3TC/IDV 2005		K103N	
PA_68	AZT/3TC/EFV 2005		Y318F	
PA_75	AZT/3TC/EFV 2004		K103N	

\*Sólo se muestran aquellas mutaciones asociadas con resistencia alta o intermedia de acuerdo con el programa de la base de datos de la Universidad de Stanford (6).

# **DISCUSIÓN**

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1. Análisis filogenético de las secuencias de los genes *gag*, *env* y *pol*

El conocimiento de la epidemiología molecular del VIH-1 en los países de Centroamérica, entre los que se encuentra Panamá, es relativamente limitado y son pocos los datos publicados de distribución de subtipos en la mayoría de los países de la región. Uno de los principales objetivos de este estudio fue examinar por primera vez la variabilidad genética del VIH-1 en Panamá. Para ello se analizaron 147 muestras de pacientes con SIDA y seropositivos a VIH-1 asintomáticos residentes en Panamá, secuenciándose segmentos parciales de los genes *gag* (p17), *env* (C2-C4) y *pol* (PR-TI). Los resultados revelaron que el subtipo B es la forma genética predominante en la epidemia del VIH-1 en Panamá, detectándose solamente dos virus de formas genéticas no B, ambos recombinantes intersubtipo, en dos pacientes con SIDA (Figuras 24-26).

Los resultados son concordantes con los descritos en otros países de la región centroamericana (Honduras, Guatemala, El Salvador, Belice, Costa Rica, Nicaragua y México) y en la vecina Colombia. En todos ellos, la forma genética predominante del VIH-1 es el subtipo B, que, de hecho, es la única que se ha demostrado que circula en estos países, aunque se han descrito casos esporádicos de infecciones con otras formas genéticas (51, 52, 167, 278, 317, 457, 497), presumiblemente adquiridas o con vínculos epidemiológicos fuera de la región. Entre las formas genéticas no B identificadas en estos países, los recombinantes BF son los más frecuentes, habiéndose detectado en Guatemala (52), Costa Rica (457), México (52, 497) y Colombia (167).

El subtipo B es igualmente la forma genética predominante del VIH-1 en el resto de los países del continente americano y del Caribe, con la excepción de Cuba, donde diversas formas genéticas de origen africano (probablemente importadas por militares cubanos estacionados en diversos países africanos en la década de 1980) y recombinantes BG de origen local son en conjunto más prevalentes que el subtipo B (99, 117, 259, 280, 281, 349, 352, 354, 472), y Uruguay, donde los recombinantes BF, la mayoría correspondientes a

CRF12\_BF y CRF38\_BF o relacionados con las mismas, son predominantes (91, 215, 401, 504). Los recombinantes BF relacionados con la CRF12\_BF también circulan ampliamente en Argentina, representando aproximadamente el 40% de las infecciones por VIH-1 (91, 143, 190, 215, 340, 356, 466, 470), y de forma minoritaria en Bolivia (91, 199, 215), Paraguay (39) y Chile (391-393, 425), habiéndose detectado esporádicamente en Perú (95, 215, 516), Ecuador (215) y Venezuela (103, 105, 131, 425). En Chile, también circula la CRF44\_BF (132). En Brasil, aunque el subtipo B predomina en el conjunto del país, la epidemiología molecular del VIH-1 es compleja, siendo el subtipo C (junto con la CRF31\_BC, cuyo genoma es en su mayor parte de subtipo C) el más prevalente en algunas zonas del sur del país y circulando también el subtipo F, y, de forma muy minoritaria en el conjunto del país, diversas formas recombinantes circulantes BF (CRFs 28, 29, 39, 40 y 46) (81, 127, 128, 193, 198, 312, 373, 407, 414, 427, 469, 499).

Se ha estimado que el subtipo B causa aproximadamente el 11% de las infecciones por VIH-1 en el mundo (211), siendo la forma genética del VIH-1 con una diseminación geográfica más amplia. Ninguna otra forma genética del VIH-1 predomina en tantos países del mundo, tanto en América del norte, centro y sur y el Caribe, como en Europa occidental y central, norte de África, Corea, Japón y Australia (49, 211). El subtipo B se considera una variante temprana del subtipo D procedente de África (186) que, de acuerdo con los análisis de reloj molecular, comenzó a propagarse en Haití hacia 1966, fecha que sugiere que la llegada del virus a este país pudo haber ocurrido con el retorno de los profesionales haitianos que trabajaron en República del Congo (actual República Democrática del Congo) en la década de 1960. De acuerdo con los resultados descritos por Gilbert *et al.* (186), desde Haití el subtipo B se propagó, por una parte, a Trinidad y Tobago y, por otra, mediante una única introducción, a los Estados Unidos, desde donde se diseminó al resto del mundo. Los virus derivados de esta última introducción y subsiguiente diseminación global forman el llamado clado pandémico, cuyo ancestro común más reciente se dató en torno a 1969. Sin embargo, Junqueira *et al.* (238) proponen que la diseminación del subtipo B en América no fue unidireccional,

como inicialmente se sugirió, sino que se produjo una propagación del subtipo B en Sudamérica directamente del Caribe concomitantemente a su diseminación en Norteamérica.

El predominio del subtipo B en Panamá es independiente del grupo de riesgo y la región geográfica. La principal ruta de transmisión del virus en el país es por contacto sexual. En este estudio, 86 (52,8%) de las muestras analizadas corresponden a transmisión heterosexual, indicando que esta vía de transmisión es la que contribuye de forma más importante a la diseminación de la epidemia de VIH-1 en el país. Resultados similares han sido descritos en epidemias de subtipo B por transmisión heterosexual en Trinidad y Tobago (107, 111), Jamaica (213) y el resto del Caribe (321). En las etapas iniciales de la epidemia por VIH-1, la transmisión del subtipo B ocurría principalmente entre HSH en la mayoría de los países, habiéndose descrito también la asociación del subtipo B con HSH en países en los que circula otra forma genética asociada a otras vías de transmisión, como en Sudáfrica, donde el subtipo C se transmite predominantemente por vía heterosexual (490), Rusia, donde predomina el subtipo A, transmitido entre UDIs (75, 474, 498), o Argentina, donde los recombinantes BF son los más prevalentes entre infecciones adquiridas por vía heterosexual y entre UDIs (470). La infrecuente transmisión por vía heterosexual del subtipo B en las etapas iniciales de la epidemia de VIH-1 dio lugar a proponer su causa en las propiedades biológicas intrínsecas del virus (436), pero esta hipótesis fue refutada con la posterior descripción de epidemias de subtipo B propagadas por vía heterosexual en el Caribe (107, 321). Actualmente no hay evidencias de que distintos subtipos de VIH-1 posean ventajas selectivas para distintas vías de transmisión y se cree que las asociaciones de algunas formas genéticas con determinadas vías de transmisión se deben a un “efecto fundador”, por el cual la primera forma genética que se introduce en una población adquiere una ventaja inicial sobre otras formas genéticas que se introducen posteriormente (222), manteniéndose como la forma predominante debido a eficiencias similares en la transmisión y a restricciones a la reinfección, particularmente en las fases crónicas de la infección.

En este estudio se analizó también la estructura filogenética dentro del subtipo B, identificándose en secuencias de PR-TI de virus de dicho subtipo siete *clusters* filogenéticos con 4 o más virus (designados B-PA1 a B-PA7), en los que agruparon la mayoría (71,6%) de los virus de Panamá (Figura 27), comprendiendo el *cluster* más amplio, B-PA1, el 32,1% de los virus de subtipo B. Además, se observaron correlaciones geográficas de algunos *clusters*: B-PA1 con Panamá oriental y B-PA2 y B-PA4 con el occidente del país (Figura 29). No se encontró correlación entre los *clusters* y exposición de riesgo. Sin embargo, hay que tener en cuenta que en 43 casos (26,4%) no se especificó el tipo de conducta de riesgo, debido a que este dato no se incluye en los registros clínicos de los hospitales, lo que pudo afectar los resultados de los análisis de correlación estadística entre los *clusters* y el riesgo de exposición (por el contrario, sólo hubo 9 pacientes en los que no se registró su lugar de residencia). Dejando de lado este hecho y si se acepta como real la falta de asociación entre *clusters* y vía de transmisión o conducta de riesgo encontrada en los análisis, este dato indicaría que en la epidemia de VIH-1 de Panamá no existen redes de transmisión separadas de homosexuales y heterosexuales, sino que las transmisiones de VIH-1 entre ambos grupos de individuos están intrínsecamente ligadas en la epidemia, quizá debido a una alta frecuencia de individuos bisexuales entre los HSH, y que no existe una selección genética de VIH-1 de acuerdo con la vía de transmisión. De hecho según datos de ONUSIDA, Panamá, México y en menor medida Perú, son los países de Latinoamérica donde la vía homosexual y heterosexual están más igualadas en porcentajes (28, 463). Además, el temor al estigma y al rechazo en los homosexuales les puede llevar a mantener relaciones sexuales con mujeres, lo cual fomentaría la transmisión del VIH por vía heterosexual formándose un puente de transmisión del virus entre estos grupos (28, 463). La falta de correlación entre *clusters* y vías de transmisión en Panamá es similar a lo descrito en las epidemias de VIH-1 en Barbados y San Petersburgo, encontrándose en el país caribeño una falta de asociación de variantes de subtipo B, definidas de acuerdo con secuencias de V3, y grupos de riesgo homo, bi y heterosexuales (189) y en la ciudad rusa la falta de asociación de *clusters* de subtipo A con transmisión entre UDIs o por vía heterosexual (474).

Los siete *clusters* filogenéticos de subtipo B de Panamá sólo pudieron ser identificados en PR-TI cuando las secuencias se analizaron por inferencia bayesiana, presentando todos ellos un apoyo filogenético robusto ( $PP \geq 0,95$ ), aunque en dos *clusters*, B-PA1 y B-PA3, fue necesario excluir algunas secuencias que ramificaban en posición basal con respecto a los mismos para alcanzar dichos valores de PP. El hecho de que estos *clusters* no fueran detectados en las regiones de *gag* y *env* puede ser debido a que los fragmentos analizados fueron relativamente cortos ( $< 700$  pb), lo que puede explicar una insuficiente señal filogenética, y en el caso del fragmento de *env*, a la alta variabilidad de algunos de los segmentos secuenciados, que puede dar lugar a alta frecuencia de homoplasias que afecten a la reconstrucción filogenética.

La datación molecular realizada con un método bayesiano permitió estimar el origen de los *clusters* de subtipo B de Panamá en la década de 1970, con promedios de estimaciones del tMRCA de los distintos *clusters* entre 1971 y 1977 para 5 de ellos, con la excepción de B-PA5 (que comprende 6 virus), cuyo tMRCA se estimó en 1980. Estas estimaciones son concordantes con las obtenidas recientemente con virus recolectados en seis países centroamericanos, en los que se identificaron 5 *clusters* cuyo origen se estimó en 1966 en uno de ellos y entre 1971 y 1976 los otros 4 (318) (en dicho estudio, solamente una de las secuencias de Panamá analizadas pertenecía a uno de los *clusters* identificados, por lo que probablemente no se correspondan a los identificados en el actual estudio, lo cual no se ha podido comprobar debido a que las secuencias no están disponibles en bases de datos públicas). El intervalo de 13 años transcurrido entre el origen estimado del *cluster* más antiguo de Panamá y el primer caso de SIDA en el país en 1984 también es consistente con el intervalo de 12 años transcurrido entre el tMRCA estimado en 1969 para la epidemia de VIH-1 en EE.UU. y el reconocimiento de los primeros casos de SIDA en dicho país en 1981 (186).

La existencia de *clusters* filogenéticos intrasubtipo, como los encontrados en Panamá, probablemente es bastante más frecuente de lo descrito, aunque en

muchas epidemias de VIH-1 pueden no haberse detectado como consecuencia de la utilización de métodos de inferencia filogenética que no reconstruyen la verdadera estructura filogenética, cuando en los análisis se incluyen secuencias que tienen relaciones ambiguas con uno o más *clusters*, lo cual es frecuente en el VIH-1 debido a altos ritmos de mutación y recombinación, que dan lugar a sustituciones homoplásicas y a genomas en mosaico con fragmentos derivados de diferentes variantes, lo que puede interferir en la formación de *clusters* filogenéticos (511).

La existencia de *clusters* filogenéticos intrasubtipo de VIH-1 que comprenden una proporción importante de las infecciones, en algunos casos con correlaciones epidemiológicas o geográficas, ha sido descrita previamente en otros países, como Cuba (subtipo B) (349), Brasil (subtipo B) (433), Etiopia (subtipo C) (399, 473) y Rusia (subtipo A) (474), y en África subsahariana, la mayoría de los virus de subtipo C agrupan en *clusters* filogenéticos, todos ellos con asociaciones estadísticamente significativas con uno o más países del sur o el este del continente (473). Estos *clusters* pueden derivar de múltiples introducciones de una forma genética de VIH-1 o pueden reflejar la existencia de múltiples redes de transmisión activas en un país o región. En el caso de Panamá, la datación molecular de los *clusters*, en la década de 1970 (Tabla 13), apoya el escenario de múltiples introducciones del subtipo B en el país al comienzo de la epidemia. Una explicación alternativa es que los *clusters* reflejen el establecimiento de diversas redes de transmisión local a principios de la epidemia de VIH-1 en Panamá, aunque el agrupamiento de algunos *clusters* con virus de diferentes países en genomas completos (Figura 33) apoya la primera de las hipótesis. Las secuencias que ramifican por fuera de los *clusters* o en posición basal con respecto a los mismos (Figura 27) pueden representar introducciones separadas o virus recombinantes intercluster (los cuales frecuentemente ramifican basalmente con respecto a uno de los *clusters* parentales, como se ha descrito en el subtipo C de África) (475).

En el árbol filogenético de PR-TI, seis virus de Panamá agruparon por fuera del subclado pandémico de subtipo B, al igual que el virus de referencia RF



procedente de Haití, país en el que se inició la propagación del subtipo B (Figura 27) (186). Una posible explicación de la topología de estos virus es que deriven de la radiación inicial del subtipo B iniciada en Haití, que también alcanzó a otros países del Caribe (186, 238), previamente a la emergencia del clado pandémico, probablemente originado en EE.UU. (186).

El análisis mediante *bootscanning* de los dos virus de formas genéticas no B, ambos procedentes de pacientes con SIDA, indica que ambos virus corresponden a formas recombinantes únicas (Figura 30). En los árboles filogenéticos, el primero, PA\_15, agrupa con referencias de la CRF02\_AG en *gag* y *env* y con el subsubtipo A3 en *pol*; y el segundo, PA\_39, con referencias de la CRF12\_BF en los tres genes (Figuras 24-26), aunque el análisis mediante *bootscanning* en *pol* indica que PA\_15 contiene un fragmento de ~ 200 nt en proteasa derivado de la CRF02\_AG y PA\_39 contiene un fragmento de ~ 200 nt en TI de subtipo B no derivado de la CRF12\_BF. Estos resultados refuerzan la importancia de analizar múltiples regiones del genoma para una mejor caracterización genética de los virus, particularmente de aquellas formas genéticas que cocirculan con otras variantes en las mismas áreas geográficas, como son la CRF02\_AG y la CRF12\_BF.

## 5.2. Análisis filogenético de las secuencias de los genomas completos

El análisis filogenético de 36 genomas completos de subtipo B confirmó la existencia de todos los *clusters* intrasubtipo B identificados en PR-TI (Figura 27), con la excepción de los *clusters* B-PA3 y B-PA5, que en genomas completos agrupaban en un único *cluster* (B-PA3-5), que a su vez agrupaba con el *cluster* B-PA6, formando el *supercluster* B-PA3-5-6. En este análisis también se observaron tres virus con topología discordante entre los árboles de PR-TI y de genomas completos (Figura 31). En el análisis de estos tres virus (PA\_8, PA\_34 y PA\_203) mediante *bootscanning* y árboles filogenéticos de segmentos parciales utilizando como referencias virus de los distintos *clusters* del subtipo B de Panamá con topología congruente, se observaron alternancias en los agrupamientos de los tres virus a largo del genoma (Figuras 35-37). Estos resultados indican que los tres virus son recombinantes intrasubtipo B,

cuyo genoma recombinante está constituido por segmentos que derivan de distintos *clusters* de Panamá, B-PA1 y B-PA3-5 (PA\_8), B-PA1 y B-PA2 (PA\_34), y B-PA1 y B-PA3-5 (PA\_203), respectivamente, y regiones que no agrupan con ninguno de los *clusters*. La falta de agrupamiento de tales segmentos con los *clusters* de Panamá puede deberse a varias causas: 1) su origen a partir de un virus que no pertenece a ninguno de dichos *clusters*; 2) la presencia de puntos de rotura *intercluster* muy próximos entre sí; 3) la insuficiente señal filogenética en fragmentos relativamente conservados que no permiten obtener buenos valores de *bootstrap* que apoyen los *clusters* en dichos segmentos. Sin embargo, cada segmento agrupó con los virus de referencia de subtipo B con valores de *bootstrap*  $\geq 70\%$ . Los resultados de estos análisis permiten identificar estos tres virus como recombinantes intrasubtipo y determinar la estructura en mosaico de la mayor parte de su genoma, identificando el *cluster* parental de cada uno de sus segmentos.

Los virus PA\_8, PA\_34 y PA\_203 constituyen los primeros virus recombinantes intrasubtipo de VIH-1 caracterizados en genoma completo descritos en Latinoamérica de los que tengamos conocimiento. Su identificación confirma que en áreas geográficas en las que circula una única forma genética del VIH-1 es posible la recombinación intragenotípica. Una alta frecuencia de recombinación intrasubtipo ya se había descrito previamente en el subtipo C en África subsahariana (399, 473).

Debido a la mayor similitud entre las secuencias, es más difícil detectar la recombinación intrasubtipo que la recombinación intersubtipo. Dentro de un subtipo la variación media en las secuencias de aminoácidos es del 8 al 17%, dependiendo de las proteínas, mientras que entre subtipos es del 17 al 35% (255). Sin embargo, la identificación de *clusters* filogenéticos intrasubtipo caracterizados en genomas completos puede permitir la detección de recombinantes intrasubtipo en virus cuyo agrupamiento con los genomas de referencia de los distintos *clusters* cambia a lo largo del genoma, tal como hemos descrito en el actual trabajo.

El mecanismo de recombinación permite al VIH-1 dar un salto evolutivo mucho más rápido y de mayor magnitud que el resultante de la acumulación progresiva de mutaciones, generando una gran diversidad de variantes diferentes, posiblemente con distintas propiedades biológicas, resistencias a antirretrovirales o susceptibilidades a respuestas inmunes.

El análisis de los genomas completos de los virus de los *clusters* del subtipo B también permitió determinar que los *clusters* B-PA3, B-PA5 y B-PA6 agrupan en un *supercluster*. En los árboles de PR-TI, este *supercluster* no fue detectado, lo cual puede explicarse por la insuficiente señal filogenética y por la presencia de las secuencias recombinantes intrasubtipo PA\_8, PA\_34 y PA\_203. Al realizar la poda selectiva de estas secuencias en los árboles de genoma completo, los tres *clusters* agruparon con un valor de *bootstrap* de 99% (Figura 32). La presencia de secuencias con señal filogenética conflictiva o ambigua puede dar lugar a clados con bajo apoyo filogenético, los cuales forman grupos filogenéticos bien definidos cuando dichas secuencias se excluyen del análisis (116, 511). Análisis previos realizados con secuencias de VIH-1 de Argentina (470), Rusia (474), y África (473), sugieren que estas secuencias inestables frecuentemente corresponden a virus recombinantes, los cuales tienden a ocupar posiciones basales con respecto a algunos de los clados parentales.

Los análisis filogenéticos de secuencias de los genomas completos de subtipo B de Panamá junto con los de otros países depositados en la base de datos de Los Alamos permitieron determinar que el *cluster* B-PA3-5 agrupa con tres virus de Sudamérica, dos de ellos de Brasil y uno de Uruguay, que el *cluster* B-PA1 agrupa con un virus de Colombia, y que el *cluster* B-PA7 está relacionado con virus de Estados Unidos y Francia (Figura 33). Estos resultados sugieren la existencia de al menos tres introducciones independientes del subtipo B de VIH-1 en Panamá, estando los *clusters* más amplios relacionados con virus de países sudamericanos.

Dentro del subtipo B, además de los virus que agrupaban en *clusters*, se analizó el genoma completo de uno (PA\_10) de los seis que en PR-TI ramificaban en posición basal con respecto al clado pandémico. El análisis confirmó la topología basal de PA\_10 que ramificaba en dicha posición junto con el virus de origen haitiano RF (Figura 31), lo cual demuestra la propagación prepandémica del subtipo B desde Haití (186) hasta Centroamérica. Previamente, solo se habían obtenido genomas completos de virus de subtipo B prepandémicos de muestras obtenidas de islas del Caribe (321) y de un haitiano residente en EE.UU. (RF) (441).

El análisis del genoma completo mediante *bootscanning* y árboles filogenéticos de segmentos parciales de los dos virus recombinantes intersubtipo, inicialmente detectados en fragmentos parciales, demostró que representan formas recombinantes únicas generadas por recombinación secundaria entre un subtipo y una CRF, correspondiendo PA\_15 a un recombinante entre la CRF02\_AG y el subsubtipo A3 y PA\_39 a un recombinante entre la CRF12\_BF y el subtipo B, confirmándose los resultados de los análisis de segmentos parciales, y permitiendo analizar las estructuras en mosaico de dichos recombinantes. La estructura de PA\_15 corresponde a un genoma predominantemente derivado de la CRF02\_AG, con la mayor parte de *pol* y el segmento 5' de *vif* derivados del subsubtipo A3, mientras que el genoma de PA\_39 agrupa mayoritariamente con la CRF12\_BF, derivando de un virus de subtipo B diferente del parental de la CRF12\_BF un fragmento de unos 200 nt en proteasa, la gp120 y los fragmentos colindantes de *vpu* y gp41 (Figuras 38 y 39). Estos virus recombinantes representan las primeras URFs descritas hasta el momento en Panamá.

PA\_15 corresponde a un hombre heterosexual de 44 años de edad, con SIDA desde el 2004, procedente de la Provincia de Bocas del Toro (Panamá occidental) y PA\_39 a un hombre heterosexual de 38 años de edad, diagnosticado de infección por VIH-1 en 1989 y con SIDA desde el 2004, procedente de la Provincia de Panamá. Ambos individuos fueron infectados por VIH-1 en Panamá, ya que en sus datos epidemiológicos no reconocen haber

viajado fuera del país. Dado que no existen evidencias que las formas genéticas detectadas en estos individuos circulen en Panamá o en países próximos, su origen debe presuponerse que se encuentra fuera de esta región geográfica, habiendo sido probablemente adquiridas mediante contactos sexuales de individuos que viajaron a Panamá. Los análisis genéticos de los virus pueden proporcionar información sobre la procedencia más probable de dichas variantes. Así, la CRF12\_BF y recombinantes relacionados con la misma circulan ampliamente en el cono sur de América, con una alta prevalencia en Argentina (91, 215, 340, 466, 470) y Uruguay (91, 215), y con menor prevalencia en Paraguay (39), Chile (391-393, 425) y Bolivia (91, 199, 215), por lo que es probable que el recombinante BF detectado en Panamá tenga relación epidemiológica con alguno de estos países. Fuera de éstos y de Brasil, se han detectado casos esporádicos de recombinantes BF en bastantes países de Latinoamérica y el Caribe: Perú (95, 215, 516), Colombia (167), Venezuela (103, 104, 131), Costa Rica (457), Guatemala (52), México (51, 497), y Cuba (349). Con respecto al recombinante CRF02\_AG/A3, las dos formas genéticas de las que deriva circulan en África occidental, siendo la CRF02\_AG la forma genética predominante en dicha área geográfica y habiéndose descrito URFs derivados de recombinación entre la misma y el subsubtipo A3 en Ghana (130) y Togo (520). Aunque la CRF02\_AG se ha detectado en Ecuador (96) y Brasil (81, 129, 166, 279), no se ha descrito que el subsubtipo A3 circule en dichos países, por lo que el origen del recombinante identificado en Panamá es probablemente África occidental.

Los resultados de este estudio, por lo tanto, apoyan la importancia de analizar genomas completos de VIH-1 para determinar la diversidad genética del virus en una epidemia y para la identificación y caracterización de formas recombinantes intra e intersubtipo. Estos análisis permiten obtener inferencias sobre el origen, evolución y diseminación de los virus en una población, que no serían posibles con análisis de fragmentos más cortos, y que podrían tener implicaciones importantes para estudios epidemiológicos o biológicos del VIH-1, así como para el diseño de vacunas adaptadas a las variantes circulantes en cada área geográfica.

### 5.3. Análisis de resistencia a medicamentos antirretrovirales

El análisis genotípico de resistencia a medicamentos ARV reveló que 9,7% de los pacientes con SIDA y ninguno de los individuos seropositivos a VIH-1 asintomáticos sin tratamiento ARV previo albergaban mutaciones de resistencia (Tabla 15). Las prevalencias de resistencias a ARV detectadas en Panamá son menores que las descritas en estudios similares en otros países de Latinoamérica y el Caribe, en los que se encontraron las siguientes prevalencias en individuos tratados y sin tratamiento ARV previo, respectivamente: Chile, 77% y 2,5% (391); Perú, 31,3% y 3,3% (264); Venezuela, 26% y 3% (131); Brasil, 24,6% (solamente pacientes tratados) (414); Honduras, 74,4% y 16,6%; El Salvador, 66,7% y 10% (219); Jamaica, 35% y 29% (206); Cuba, 82,2% y 9,6% (352). En otros países solamente se han realizado estudios para determinar la prevalencia de mutaciones de resistencia transmitida en adultos, con los siguientes resultados: México, 16% (2002-2003) y 7,4% (2005-2010) (51, 159); Colombia, 5,8% (141); Venezuela, 10% (asintomáticos) y 6,4% (diagnóstico reciente) (78, 103); Argentina, 7,7% (356); Honduras, 9,2% (2002-2003) y 7% (2004-2007) (278, 317); Guatemala, 8,3% (52); República Dominicana, 7,8% (320). En Honduras, Belice y Cuba se analizó la prevalencia de resistencias a ARV en niños infectados por VIH-1 por transmisión vertical encontrándose prevalencias del 13%, 27% y 33,3%, respectivamente (341, 354). Recientemente, Pineda-Peña *et al.* (359), estimaron la prevalencia global de resistencia transmitida en América Latina y el Caribe en 7,7% para el período de 1996-2009 y por región: México, 6,8%; Caribe, 4,3%; Brasil, 9,4%; la región andina, 10,5%; cono sur, 4,9%. Sin embargo, otros estudios han documentado una prevalencia algo menor para Latinoamérica, del 6,3% (173).

En Panamá los datos más recientes de mutaciones de resistencia a medicamentos ARV corresponden a un estudio de resistencia transmitida en el que se analizaron secuencias de PR-TI de 47 adultos sin tratamiento ARV previo (con edades  $\leq 26$  años) y 25 pacientes pediátricos (rango de edad de 9 días a 1 año), con muestras recolectadas en 2008-2010 (102). Se detectaron 6 adultos y 3 niños con una o más mutaciones asociadas a resistencia. De las

muestras de adultos, 3 tenían mutaciones de resistencia a ITIAN, 1 a ITINN, 1 a IP y 1 a ITIAN + ITINN; y en las muestras de los niños, 2 tenían resistencia a ITIAN y 1 a ITINN. La prevalencia de resistencia transmitida en adultos fue descrita como moderada para ITIAN e ITINN (10,6%) y baja para IP (2,1%); y en niños, moderada para ITIAN e ITINN (12%). Los resultados de este estudio no pueden compararse con los del estudio actual, ya que la prevalencia de mutaciones de resistencia fueron clasificadas según los parámetros de la OMS (319). En esta tesis se utilizó el algoritmo de la base de datos de la Universidad de Stanford (386), que asigna una puntuación de penalización a cada mutación de resistencia de acuerdo con su impacto en la resistencia a ARV, permitiendo inferir distintos niveles de resistencia a los fármacos, mientras la OMS utiliza una lista de mutaciones o sistema universal para determinar la resistencia a medicamentos ARV.

La baja prevalencia de mutaciones a medicamentos ARV en pacientes con SIDA encontrada en el actual estudio puede deberse al corto período de tiempo transcurrido desde la implementación y uso generalizado de la terapia ARV en Panamá hasta la fecha en que se recolectaron las muestras utilizadas en este estudio. En Panamá el uso de medicamentos ARV se inició por parte del Ministerio de Salud en 1999 para los pacientes asegurados y en 2002 para el resto de la población (15), recolectándose las muestras del estudio actual en 2004-2005. En los individuos asintomáticos sin tratamiento ARV previo, la falta de detección de virus resistentes a ARV también puede estar influida por el hecho de no haberse recolectado muestras de infecciones recientes, por lo que es posible que una proporción importante de los pacientes hayan adquirido la infección varios años antes, en un periodo en el que la prevalencia de resistencia transmitida en Panamá era baja debido a la limitada utilización de medicamentos ARV; también es posible que, en caso de haberse adquirido un virus con mutaciones de resistencia, en el tiempo transcurrido desde la infección se hayan producido reversiones en las mutaciones de resistencia que afectan a la *fitness* (capacidad replicativa) viral, pudiendo mantenerse una población minoritaria resistente que no es detectable por la secuenciación poblacional realizada en este estudio (411). La diferencia con otros países

también puede derivar de diferencias en el grado de adherencia a los regímenes terapéuticos. Como consecuencia del incremento en la utilización de medicamentos ARV en Panamá, es previsible que aumente la prevalencia de transmisión de virus resistentes a los mismos, por lo que es importante continuar con la vigilancia epidemiológica de resistencia a medicamentos ARV en el país.

Las mutaciones de resistencia detectadas en los 8 pacientes con SIDA fueron consistentes con los regímenes terapéuticos aplicados, excepto para dos pacientes. En la muestra PA\_14 se detectó la mutación T215S. Las mutaciones T215S/C/D/E/V/A/N representan reversiones de la mutación de resistencia a ITIAN T215Y. Estas mutaciones no reducen la susceptibilidad a ITIAN, pero su presencia sugiere que pudo haberse transmitido un virus resistente (6). En este paciente la obtención de la muestra y el comienzo de la terapia ARV tuvieron lugar en el mismo mes, lo cual sugiere que la mutación T215S pudo derivar de un virus transmitido.

En las muestras PA\_23 y PA\_59 se detectaron las mutaciones de resistencia a ITINN L100I y K103N (Tabla 15). Sin embargo, los expedientes clínicos de ambos pacientes no indican el uso de fármacos ITINN, por lo que este hallazgo de virus resistentes a esta clase de fármacos sugiere la posibilidad de su adquisición mediante reinfección. En Panamá, el EFV es el principal ITINN utilizado dentro del primer esquema de tratamiento ARV (15). Esta familia de fármacos se caracteriza por tener una baja barrera genética, necesitándose una sola mutación para desarrollar un nivel alto de resistencia, lo cual puede dar lugar a la selección de virus resistentes en un plazo de semanas a meses (351). Además, los virus con estas mutaciones se caracterizan por una limitada reversión a la cepa salvaje y un buen *fitness* biológico (77). K103N es la mutación de resistencia a ITINN más frecuente, confiriendo un alto grado de resistencia a toda la familia y estando asociada a fracaso virológico (100). Las autoridades sanitarias deberán considerar que la mutación K103N podría llegar a ser frecuente debido al uso extendido de EFV y NVP en Panamá y a la capacidad del virus para seleccionar rápidamente mutaciones de resistencia a



estos fármacos durante una supresión viral incompleta. Este escenario limitaría las opciones en el tratamiento de primera línea y aumentaría los costos, debido a que los esquemas terapéuticos de segunda línea son más costosos y la oportunidad de realizar genotipificación es restringida.

El aumento en el acceso a fármacos ARV conlleva como consecuencia la emergencia de virus resistentes, lo que representa un serio problema de salud pública y reduce las opciones de tratamiento ARV efectivo disponibles para los individuos infectados e incrementa el riesgo de fracaso virológico (30). Esta situación afecta principalmente a los países en vías de desarrollo en los que el acceso a algunos medicamentos ARV como IP y los pertenecientes a las nuevas clases de agentes terapéuticos es limitado (173, 359). Por lo tanto, es importante establecer sistemas de vigilancia epidemiológica para detectar resistencias a medicamentos ARV e implementar medidas preventivas, siguiendo las recomendaciones de la OMS, destinadas especialmente a los países en los que el acceso a ARV es reciente (64).

En conclusión, en el trabajo desarrollado en esta tesis se ha analizado por primera vez la diversidad genética del VIH-1 en Panamá, observándose un predominio del subtipo B, en el que se han identificado 7 *clusters* monofiléticos que comprenden la mayoría de los virus de Panamá, probablemente derivados de diversas introducciones en el país, tres de los cuales tienen correlaciones con áreas geográficas de Panamá, y detectándose dos virus recombinantes intersubtipo. Además, se caracterizaron 38 secuencias de genomas completos de VIH-1, los primeros obtenidos en Centroamérica, que permitieron confirmar la estructura en *clusters* detectada inicialmente en secuencias de *pol*, identificar recombinantes intrasubtipo, caracterizar las estructuras en mosaico de los dos recombinantes intersubtipo detectados y establecer las relaciones filogenéticas de tres *clusters* con virus de otros países. Asimismo se analizaron las mutaciones de resistencia asociada a medicamentos ARV en pacientes con SIDA y asintomáticos sin tratamiento ARV previo, sin que se detectara ningún caso de resistencia transmitida.

La información obtenida en este estudio ha permitido conocer mejor la propagación epidémica del VIH-1 en Panamá y puede ser relevante para el manejo y cuidado de los pacientes, así como para la implementación de medidas de salud pública destinadas a prevenir la transmisión de virus resistentes a ARV y la propagación de formas genéticas diversas del VIH-1. Para ello, es importante mantener la vigilancia epidemiológica molecular sobre la epidemia de VIH-1, particularmente teniendo en cuenta la fuerte migración que ocurre en Panamá producto de la situación económica y geográfica, la ampliación del Canal de Panamá y la expansión de los puertos internacionales. Otros estudios a considerar en el futuro son la investigación de las posibles correlaciones biológicas de los *clusters* de subtipo B y su susceptibilidad a respuestas inmunes, lo cual puede ser relevante para estudios sobre patogenia viral y vacunas. La identificación de los *clusters* intrasubtipo también permitirá realizar estudios sobre reinfecciones, los cuales pueden ser de gran importancia conceptual para el desarrollo de vacunas, ya que permiten analizar la correlación entre la diversidad genética del VIH-1, incluyendo la diversidad intrasubtipo, y respuesta inmune protectora frente a una nueva infección.

# **CONCLUSIONES**

## 6. CONCLUSIONES

1. La epidemia de VIH-1 en Panamá está causada por virus del subtipo B, habiéndose detectado dos casos esporádicos de infección por virus de formas recombinantes intersubtipo.
2. En análisis filogenéticos de secuencias de PR-TI se identificaron siete *clusters* filogenéticos de  $\geq 4$  individuos en el subtipo B que comprendían la mayoría de virus de dicho subtipo, tres de los cuales, incluyendo el más amplio, de 43 individuos, tenían asociaciones geográficas con Panamá oriental u occidental.
3. La existencia de los *clusters* identificados en PR-TI fue confirmada mediante análisis filogenéticos de 36 genomas completos, aunque en este análisis dos de los *clusters* identificados en PR-TI agrupaban en un único *cluster*. Dichos análisis también permitieron establecer la relación filogenética de dos *clusters* de Panamá con virus de Sudamérica y de otro con virus de Estados Unidos y Francia.
4. Mediante un método de datación molecular bayesiano se estimó el origen de 5 de los *clusters* de subtipo B de Panamá en la década de 1970 y de uno hacia 1980.
5. La identificación de *clusters* filogenéticos que comprenden la mayoría de virus de subtipo B de Panamá, originados en etapas tempranas de la epidemia de VIH-1 en dicho país, y varios de ellos relacionados filogenéticamente con virus de diferentes países, sugiere la existencia de múltiples introducciones del subtipo B en Panamá.
6. Los análisis de genomas completos de VIH-1 en Panamá también permitieron identificar tres virus recombinantes intrasubtipo B y la caracterización de dos virus recombinantes únicos CRF02\_AG/A3 y CRF12\_BF/B.

7. Se han identificado en Panamá 6 virus de subtipo B derivados de la propagación prepandémica de dicho subtipo, probablemente originada en Haití, de acuerdo con estudios publicados por otros autores, confirmándose en uno de ellos su origen prepandémico mediante análisis del genoma completo.
8. Se detectaron mutaciones de resistencia a medicamentos ARV en el 9,7% de pacientes con SIDA, mientras que ninguno de los individuos asintomáticos sin tratamiento previo presentaba resistencia frente a ARV, indicando una escasa circulación de virus resistentes a ARV en Panamá en el momento en que se infectaron los individuos estudiados.
9. Los resultados de este estudio apoyan la importancia de analizar genomas completos de VIH-1 en estudios de epidemiología molecular, lo cual proporciona información adicional sobre el origen y diseminación de los virus en una epidemia y permite la identificación y caracterización de formas recombinantes intra e intersubtipo. La información obtenida mediante estos análisis puede tener implicaciones para estudios epidemiológicos o biológicos sobre el VIH-1.

# **BIBLIOGRAFÍA**

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Casos acumulados de mortalidad por SIDA del año 2001 al 2008 en la República de Panamá. Departamento de Epidemiología, Ministerio de Salud, Panamá. 2009.
2. Casos acumulados de SIDA del año 2001 al 2008 en la República de Panamá. Departamento de Epidemiología, Ministerio de Salud, Panamá. 2009.
3. Encuestas de vigilancia del comportamiento sobre VIH/ SIDA/ ITS en RSX y HSH del Área V de Salud. Santo Domingo, Secretaría de Estado de Salud Pública y Asistencia Social de República Dominicana. 2005.
4. Estudio de seroprevalencia del virus de inmunodeficiencia humana, sífilis y comportamiento en hombres que tienen sexo con hombres en la gran areas metropolitana de Costa Rica. San Jose, Ministerio de Salud de Costa Rica, 2009.
5. Estudio TRaC de VIH/SIDA entre trabajadoras sexuales femeninas en San Salvador, Santa Ana, San Miguel, Sonsonate y San Vicente. Guatemala City, Population Services International, 2008.
6. HIV Drug Resistance Database. Stanford University. Available at: <http://hivdb.stanford.edu/index.html>.
7. <http://biology.kenyon.edu/slanc/gene-web/Lentiviral/Lentivi2.html>.
8. [http://www.sivida.com.ar/medica/replicacion\\_vih.htm](http://www.sivida.com.ar/medica/replicacion_vih.htm).
9. Informe acumulativo de la situación de SIDA, Años:1984-2010. Departamento de Epidemiología, Ministerio de Salud, Panamá. 2010.
10. Informe acumulativo de la situación de SIDA, Años:1984-2012. Departamento de Epidemiología, Ministerio de Salud, Panamá. 2012.
11. Informe nacional sobre los progresos realizados en la aplicación del UNGASS 2012, Panamá. Departamento de Epidemiología, Ministerio de Salud, Panamá. 2012.
12. Iniciativa Regional para la Eliminación de la Transmisión Maternoinfantil del VIH y de la Sífilis Congénita en América Latina y el Caribe: ESTRATEGIA DE MONITOREO REGIONAL. Organización Panamericana de la Salud. 2010.
13. Los Alamos Database. HIV database tree tutorial. Available at: [http://www.hiv.lanl.gov/content/hivdb/TREE\\_TUTORIAL/Tree-tutorial.html](http://www.hiv.lanl.gov/content/hivdb/TREE_TUTORIAL/Tree-tutorial.html)
14. Los Alamos HIV Sequence Database. Available at: <http://hiv-web.lanl.gov>.
15. Ministerio de Salud Panamá y Organización Panamericana de la Salud. Normas para el manejo terapéutico de las personas con VIH en la República de Panamá. Ciudad de Panamá, Ministerio de Salud. 2011.
16. National HIV Programme. Country progress report to the Secretary General of the United Nations on the United Nations General Assembly Special Session. Jamaica, Ministry of Health, 2008.
17. ONUSIDA. Available at: <http://www.unaids.org/es/regionscountries/countries/>.
18. ONUSIDA. Informe de ONUSIDA Sobre la Epidemia Mundial de SIDA/2012. Accesible en: <http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidem>

- [iology/2012/gr2012/20121120\\_UNAIDS\\_Global\\_Report\\_2012\\_with\\_annexes\\_es.pdf](#).
19. Panel de expertos de Gesida y Plan Nacional sobre el SIDA. Documento de consenso de GESIDA/ Plan Nacional sobre el SIDA respecto al tratamiento antirretroviral en adultos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (actualización enero 2012). *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2012; 30(6):e1-e89.
  20. Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents. US Department of Health and Human Services. 2012 Mar; 1-239. Available from URL: <http://www.aidsinfo.nih.gov/contentfiles/adultandadolescentgl.pdf>
  21. *Pneumocystis pneumonia*--Los Angeles.1981. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 30:250-252.
  22. Presidential Commission on HIV and AIDS. UNGASS country progress report: Republic of Guyana. Georgetown, Government of Guyana. ([http://data.unaids.org/pub/Report/2008/guyana\\_2008](http://data.unaids.org/pub/Report/2008/guyana_2008)) country\_progress\_report\_en.pdf, accessed 17 October 2010.
  23. Report on the global AIDS epidemic. Geneva, UNAIDS, 2008 (<http://www.unaids.org/en/KnowledgeCentre/HIVData/GlobalReport/2008> accessed 17 October 2010).
  24. República Dominicana: encuesta demográfica y de salud 2007 (ENDESA 2007): resultados básicos. Santo Domingo, Centro de Estudios Sociales y Demográficos and Macro Internacional Inc, 2008.
  25. Summary: estimate of HIV prevalence and incidence in Canada, 2008. Ottawa, Public Health Agency of Canada, 2009.
  26. Tom Hall. Available at: <http://www.mbio.ncsu.edu/Bioedit/bioedit.html>.
  27. Trimeris. <http://trimeris.com/science/hivfusion.html>.
  28. UNAIDS. Report on the Global AIDS Epidemic. 2010. Accesible en: [http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/unaids\\_publication/2010/20101123\\_globalreport\\_en.pdf](http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/unaids_publication/2010/20101123_globalreport_en.pdf).
  29. United States Centers for Disease Control and Prevention. Incidence and diagnoses of HIV infection--Puerto Rico, 2006. *MMWR – Morbidity and Mortality Weekly Report*, 2009, 58:589–591.
  30. World Health Organization HIV/AIDS Programme. Antiretroviral therapy for HIV infection in adults and adolescents: recommendations for a public health approach. Geneva: WHO. 2010.
  31. **Abebe, A., Demissie, D., Goudsmit h, J., Brouwer, M., Kuiken, CL., Pollakis, G., et al.** 1999. HIV subtype C syncytium – and non-syncytium inducing phenotypes and coreceptor usage among Ethiopian patients with AIDS. *AIDS* 13:1305-1311.
  32. **Abecasis, A., Paraskevis, D., Epalanga, M., Fonseca, M., Burity , F., Bartolomeu, J., et al.** 2005. HIV-1 genetic variants circulation in the North of Angola. *Infect Genet Evol.* 5:231-237.
  33. **Abecasis, A. B., Deforche, K., Snoeck, J., Bachelier, L.T., McKenna, P., Carvalho, A. P., et al.** 2005. Protease mutation M89I/V is linked to therapy failure in patients infected with the HIV-1 non-B subtypes C, F or G. *Aids* 19:1799-1806.
  34. **Abrahams, M. R., Anderson, JA., Giorgi, EE., Seoighe, C., Mlisana, K., Ping, LH., et al.** 2009. Quantitating the multiplicity of infection with



- human immunodeficiency virus type 1 subtype C reveals a non-poisson distribution of transmitted variants. *J Virol* 83:3556-3567.
35. **Abram, M. E., A. L. Ferris, W. Shao, W. G. Alvord, and S. H. Hughes.** 2010. Nature, position, and frequency of mutations made in a single cycle of HIV-1 replication. *J. Virol.* 84:9864-9878.
  36. **Adamson, C. S., and E. O. Freed.** 2007. Human immunodeficiency virus type 1 assembly, release, and maturation. *Adv Pharmacol* 55:347-387.
  37. **Adjorlolo-Johnson, G., De Cock, K. M., Ekpini, E., Vetter, K. M., Sibailly, T., Brattegaard, K., et al.** 1994. Prospective comparison of mother-to-child transmission of HIV-1 and HIV-2 in Abidjan, Ivory Coast. *Jama* 272:462-466.
  38. **Adojaan, M., Kivisild, T., Man nik, A., Krispin, T., Ustina, V., Zilmer, K., et al.** 2005. Predominance of a rare type of HIV-1 in Estonia. *J Acquir Immune Defic Syndr* 39:598-605.
  39. **Aguayo, N., Laguna-Torres, V. A., Villafane, M., Barboza, A., Sosa, L., Chauca, G., et al.** 2008. Epidemiological and molecular characteristics of HIV-1 infection among female commercial sex workers, men who have sex with men and people living with AIDS in Paraguay. *Rev Soc Bras Med Trop* 41:225-231.
  40. **Ahumada Ruiz, S., Casado, C., Toala González, I., Flores Figueroa, D., Rodríguez French, A., and López Galíndez, C.** 2008. High divergence within the major HIV-1 subtype B epidemic in Panama. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 24(11):1461-1466.
  41. **Ahumada Ruiz, S., Flores Figueroa, D., Toala González, I., and Thomson, MM.** 2009. Analysis of HIV-1 pol sequences from Panama: identification of phylogenetic clusters within subtype B and detection of antiretroviral drug resistance mutations. *Infections, Genetics and Evolution*. 9(5):933-940.
  42. **Alarcón Villaverde, J.** 2009. Modos de transmisión del VIH en América Latina: resultados de la aplicación del modelo. Washington, DC, Pan American Health Organization, 2009.
  43. **Ali, A., Bandaranayake, R. M., Cai, Y., King, N. M., Kolli, M., Mittal, S., et al.** 2010. Molecular Basis for Drug Resistance in HIV-1 Protease. *Viruses* 2:2509-2535.
  44. **Altfeld, M., Allen, T., Yu, XG., Johnston, MN., Agrawal, D., Korber, BT., et al.** 2002. HIV-1 superinfection despite broad CD8+ T-cell responses containing replication of the primary virus. *Nature*. 420:434-439.
  45. **Andersson, S., Norrgren, H., da Silva, Z., Biague, A., Bamba, S., Kwok, S., et al.** 2000. Plasma viral load in HIV-1 and HIV-2 singly and dually infected individuals in Guinea-Bissau, West Africa: significantly lower plasma virus set point in HIV-2 infection than in HIV-1 infection. *Arch Intern Med* 160:3286-3293.
  46. **Apetrei, C., D. L. Robertson, and P. A. Marx.** 2004. The history of SIVs and AIDS: epidemiology, phylogeny and biology of isolates from naturally SIV infected non-human primates (NHP) in Africa. *Front Biosci*. 9:225-254.

47. **Archer, J., Pinney, J.W., Fan, J., Simon-Loriere, E., Arts, E.J., Negroni, M., et al.** 2008. Identifying the important HIV-1 recombination breakpoints. *PLoS. Comput. Biol.* 4:e1000178.
48. **Arien, K. K., A. Abrahams, M. E., Quinones-Mateu, L. Kestens, G. Vanham, and E. J. Arts.** 2005. The replicative fitness of primary human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) group M, HIV-1 group O, and HIV-2 isolates. *J Virol* 79:8979-8990.
49. **Arien, K. K., G. Van ham, and E. J. Arts.** 2007. Is HIV-1 evolving to a less virulent form in humans? *Nat Rev Microbiol* 5:141-151.
50. **Asjo, B., Morfeldt-Manson, L., Albert, J., Biberfeld, G., Karlsson, A., Lidman, K., and Fenyo, E.M.** 1986. Replicative capacity of human immunodeficiency virus from patients with varying severity of HIV infection. *Lancet.* 660-662.
51. **Avila-Rios, S., Garcia-Morales, C., Garrido-Rodriguez, D., Ormsby, C. E., Hernandez-Juan, R., Andrade-Villanueva, J., et al.** 2011. National prevalence and trends of HIV transmitted drug resistance in Mexico. *PLoS One* 6:e27812.
52. **Avila-Rios, S., Mejia-Villatoro, C. R., Garcia-Morales, C., Soto-Nava, M., Escobar, I., Mendizabal, R., et al.** 2011. Prevalence and patterns of HIV transmitted drug resistance in Guatemala. *Rev Panam Salud Publica* 30:641-648.
53. **Ayoub, A., Souquière, S., Njinku, B., Martin, P.M., Müller-Trutwin, M.C., Roques, P., et al.** 2000. HIV-1 group N among HIV-1-seropositive individuals in Cameroon. *AIDS* 14:2623-2625.
54. **Baeten, J. M., Chohan, B., Lavreys, L., Chohan, V., McClelland, R. S., Certain, L., et al.** 2007. HIV-1 subtype D infection is associated with faster disease progression than subtype A in spite of similar plasma HIV-1 loads. *J Infect Dis* 195:1177-1180.
55. **Bailes, E., Gao, F., Bibollet-Ruche, F., Courgnaud, V., Peeters, M., Marz, P.A., et al.** 2003. Hybrid origin of SIV in chimpanzees. *Science.* 300:1713.
56. **Balasubramaniam, M., and E. O. Freed.** 2011. New insights into HIV assembly and trafficking. *Physiology (Bethesda)* 26:236-251.
57. **Baldauf, S.** 2003. Phylogeny for the faint of heart: a tutorial. *TRENDS in Genetics.* Vol. 19 N° 6 June, 345-351.
58. **Ball, S. C., Abrahams, A., Collins, K. R., Marozsan, A. J., Baird, H., Quinones-Mateu, M. E., et al.** 2003. Comparing the ex vivo fitness of CCR5-tropic human immunodeficiency virus type 1 isolates of subtypes B and C. *J Virol* 77:1021-1038.
59. **Baral, S., Sifakis, F., Cleghorn, F., and Beyrer, C.** 2007. Elevated risk for HIV infection among men who have sex with men in low- and middle-income countries 2000–2006: a systematic review. *PLoS Medicine*, 2007, 4:e339.
60. **Barker, E., S. W. Barnett, L. Stamatatos, and J. A. Levy.** 1995. The human immunodeficiency viruses. En: *The Retroviridae.* J. A. Levy. vol. 4. Plenum Press. New York, United States of America.
61. **Barre-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., et al.** 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220:868-871.

62. **Barrientos, J., Bozon, M., Ortiz, E., and Arredondo, A.** 2007. HIV prevalence, AIDS knowledge, and condom use among female sex workers in Santiago, Chile. *Cadernos de Saúde Pública*, 2007, 23:1777–1784.
63. **Bello, G., Guimaraes, M. L., and Morgado, M. G.** 2006. Evolutionary history of HIV-1 subtype B and F infections in Brazil. *Aids* 20:763-768.
64. **Bennett, D. E., M. My att, S. Bert agnolio, D. Sutherland, and C. F. Gilks.** 2008. Recommendations for surveillance of transmitted HIV drug resistance in countries scaling up antiretroviral treatment. *Antivir Ther* 13 Suppl 2:25-36.
65. **Bennett, M. S., H. L. Ng, A. Ali, and O. O. Yang.** 2008. Cross-clade detection of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes does not reflect cross-clade antiviral activity. *J Infect Dis* 197:390-397.
66. **Berger, E., Murphy , PM., and Farber, JM.** 1999. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism and disease. *Annu Rev Immunol.* 17:657-700.
67. **Bermejo, M., Sánchez-Palomino, S., Usan, L., and Alcamí, J.** 2004. Dinamics of HIV replication in lymphocytes and the efficacy of protease inhibitors. *J Med Virol* 73:502-507.
68. **Bezemer, D., F. de Wolf, M . C. Boerlijst, A. van Sighem, T. D. Hollingsworth, and C. Fraser.** 2010. 27 years of the HIV epidemic amongst men having sex with men in the Netherlands: an in depth mathematical model-based analysis. *Epidemics* 2:66-79.
69. **Bieniasz, P. D.** 2006. Late budding domains and host proteins in enveloped virus release. *Virology* 344:55-63.
70. **Binley, J. M., Wr in, T., Korber, B., Zwick, M. B., Wa ng, M., Chappey, C., et al.** 2004. Comprehensive cross-clade neutralization analysis of a panel of anti-human immunodeficiency virus type 1 monoclonal antibodies. *J Virol* 78:13232-13252.
71. **Birk, M., and Sönnernborg, A.** 1998. Variations in HIV-1 pol gene associated with reduced sensitivity to antiretroviral drugs in treatment-naïve patients. *AIDS.* 12:2369-2375.
72. **Bishop, K. N., M. Verma, E. Y. Kim, S. M. Wolinsky, and M. H. Malim.** 2008. APOBEC3G inhibits elongation of HIV-1 reverse transcripts. *PLoS Pathog* 4:e1000231.
73. **Blackard, J., Cohen, DE., and May er, KH.** 2002. Human immunodeficiency virus superinfection and recombination: current state of knowledge and potential clinical consequences. *Clin Infec Dis.* 34:1108-1114.
74. **Blackard, J. T., Renjifo, B., Fawzi, W., Hertzmark, E., Msamanga, G., Mwakagile, D., et al.** 2001. HIV-1 LTR subtype and perinatal transmission. *Virology* 287:261-265.
75. **Bobkov, A. F., Kazennova, E. V., Se limova, L. M., Khanina, T. A., Ryabov, G. S., Bobkova, M. R., et al.** 2004. Temporal trends in the HIV-1 epidemic in Russia: predominance of subtype A. *J Med Virol* 74:191-196.
76. **Bocket, L., Cheret, A., Deuffic-Burban , S., Choisy, P., Gerard, Y., de la Tribonniere, X., et al.** 2005. Impact of human immunodeficiency virus type 1 subtype on first-line antiretroviral therapy effectiveness. *Antivir Ther* 10:247-254.

77. **Booth, C. L., and A. M. Geretti.** 2007. Prevalence and determinants of transmitted antiretroviral drug resistance in HIV-1 infection. *J Antimicrob Chemother* 59:1047-1056.
78. **Bouchard, M., B. Ma squelier, M. More no, L. Deibis , G. E. De Perez, H. Fleury, and E. Castro.** 2007. HIV type 1 drug resistance among naive patients from Venezuela. *AIDS Res Hum Retroviruses* 23:482-485.
79. **Brenner, B., Turner, D., Oliveira, M., Moisi, D., Detorio, M., Carobene, M., et al.** 2003. A V106M mutation in HIV-1 clade C viruses exposed to efavirenz confers cross-resistance to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Aids* 17:F1-5.
80. **Brenner, B. G., Oliv eira, M., Doualla-Bell, F., Mois i, D. D., Ntemg wa, M., Frank el, F., et al.** 2006. HIV-1 subtype C viruses rapidly develop K65R resistance to tenofovir in cell culture. *Aids* 20:F9-13.
81. **Brigido, L. F., Ferreira, J. L., Al meida, V. C., Rocha, S. Q., Ragazzo, T. G., Estevam, D. L., and Rodrigues, R.** 2011. Southern Brazil HIV type 1 C expansion into the state of Sao Paulo, Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 27:339-344.
82. **Briones, C., Domingo, E., and Molina-Paris, C.** 2003. Memory in retroviral quasiespecies: experimental evidence and theoretical model for human immunodeficiency virus. *J Mol Biol.* 331:213-229.
83. **Brouwer., K., Strathdee, SA., Magis-Rodríguez, C., Bravo-García, E., Gayet, C., Patterson, TL., et al.** 2006. Estimated numbers of men and women infected with HIV/AIDS in Tijuana, Mexico. *Journal of Urban Health*, 2006, 83:299–307.
84. **Brown, B. K., Wiec zorek, L., Sanders-Buell, E., Rosa Borges, A., Robb, M. L., Birx, D. L., et al.** 2008. Cross-clade neutralization patterns among HIV-1 strains from the six major clades of the pandemic evaluated and compared in two different models. *Virology* 375:529-538.
85. **Buonaguro, L., Tornesello, M.L., and Buonaguro, F.M.** 2007. Human immunodeficiency virus type 1 subtype distribution in the worldwide epidemic: pathogenetic and therapeutic implications. *J Virol.* Vol 81, N° 19, 10209-10219.
86. **Bures, R., Morris, L., Williams on, C., Ramjee, G., Deers, M., Fiscus, S. A., et al.** 2002. Regional clustering of shared neutralization determinants on primary isolates of clade C human immunodeficiency virus type 1 from South Africa. *J Virol* 76:2233-2244.
87. **Buzon, V., G. Natrajan, D. Schibli, F. Campelo, M. M. Kozlov, and W. Weissenhorn.** 2010. Crystal structure of HIV-1 gp41 including both fusion peptide and membrane proximal external regions. *PLoS Pathog* 6:e1000880.
88. **Candal, D. H., Pau, C. P., Luo, C. C., Granade, T., Stetler, H., Amador, L., et al.** 1997. Genetic variability of HIV type 1 in Honduras. *AIDS Res Hum Retroviruses* 13:1349-1350.
89. **Cao, H., M ani, I., Vin cent, R., M ugerwa, R., Mugy enyi, P., Kanki, P., et al.** 2000. Cellular immunity to human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) clades: relevance to HIV-1 vaccine trials in Uganda. *J Infect Dis* 182:1350-1356.
90. **Carmona, R., Pérez-Álvarez, L., Muñoz , M., Casado, G., Delgado, E., Sierra, M., et al.** 2005. Natural resistance-associated mutations to

- enfuvirtide (T20) and polymorphisms in the gp41 region of different HIV-1 genetic forms from T20 naive patients. *J Clin Virol.* 32:248-253.
91. Carr, J., Ávila, M., Gómez-Carrillo, M., Salomon, H., Hierholzer, J., Watanaveeradej, V., *et al.* 2001. Diverse BF recombinants have spread widely since the introduction of HIV-1 into South America. *AIDS.* 15:41-47.
  92. Carr, J., Salminen, MO., Koch, C., Gotte, D., Atenstein, AW., Hegerich, PA., *et al.* 1996. Full-length sequence and mosaic structure of a human immunodeficiency virus type 1 isolate from Thailand. *J Virol.* 70:5935-5943.
  93. Carr, J., Torimiro, JN., Wolfe, ND., Eitel, MN., Kim, B., Sanders-Buell, E., *et al.* 2001. The AG recombinant IbNG and novel strains of group M HIV-1 are common in Cameroon. *Virology.* 186:168-181.
  94. Carr, J., Wolfe, N., Kim, B., Torimiro, J., Eitel, M., Burke, D., *et al.* 2002. Genetic diversity of HIV-1 strains from rural Cameroon. XVI International AIDS Conference. Barcelona, July 2002 (abstract ThOrA1381).
  95. Carrion, A. G., Laguna-Torres, V. A., Soto-Castellares, G., Castillo, M., Salazar, E., Negron, E., *et al.* 2009. Molecular characterization of the human immunodeficiency virus type 1 among children in Lima, Peru. *AIDS Res Hum Retroviruses* 25:833-835.
  96. Carrion, G., Hierholzer, J., Montano, S., Alava, A., Perez, J., Guevara, A., *et al.* 2003. Circulating recombinant form CRF02\_AG in South America. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 19:329-332.
  97. Carvajal-Rodríguez, A., Crandall, K., and Posada, D. 2005. Caracterización y modelado computacional de la recombinación en secuencias de ADN en el virus del SIDA (VIH-1). Numero 2.
  98. Casado, C., García, S., Rodríguez, C., Del Romero, J., Bello, G., and López-Galíndez, C. 2001. Different evolutionary patterns are found within human immunodeficiency virus type 1-infected patients. *J Gen Virol,* 82, 2495-2508.
  99. Casado, G., Thomson, M. M., Sierra, M., Najera, R. 2005. Identification of a novel HIV-1 circulating ADG intersubtype recombinant form (CRF19\_cpx) in Cuba. *J Acquir Immune Defic Syndr* 40:532-537.
  100. Casado, J. L., Hertogs, K., Ruiz, L., Dronda, F., Van Cauwenberge, A., Arno, A., *et al.* 2000. Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance among patients failing a nevirapine plus protease inhibitor-containing regimen. *Aids* 14:F1-7.
  101. Casseb, J., Komninakis, S., Abdalla, L., Brigido, L. F., Rodrigues, R., Araujo, F., *et al.* 2002. HIV disease progression: is the Brazilian variant subtype B' (GWGR motif) less pathogenic than US/European subtype B (GPGR)? *Int J Infect Dis* 6:164-169.
  102. Castillo, J., Arteaga, G., Mendoza, Y., Martinez, A. A., Samaniego, R., Estripeaut, D., *et al.* 2011. HIV transmitted drug resistance in adult and pediatric populations in Panama. *Rev Panam Salud Publica* 30:649-656.
  103. Castillo, J., Comegna, M., Quijada, W., Jauvin, V., Pinson, P., Masquelier, B., *et al.* 2009. Surveillance of HIV type 1 drug resistance among naive patients from Venezuela. *AIDS Res Hum Retroviruses* 25:1329-1333.

104. **Castro, E., Echeverria, G., Deibis, L., Gonzalez de Salmen, B., Dos Santos Moreira, A., Guimaraes, M. L., et al.** 2003. Molecular epidemiology of HIV-1 in Venezuela: high prevalence of HIV-1 subtype B and identification of a B/F recombinant infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 32:338-344.
105. **Castro, E., M. Moreno, L. Deibis, G. de Perez, S. Salmen, and L. Berrueta.** 2005. Trends of HIV-1 molecular epidemiology in Venezuela: introduction of subtype C and identification of a novel B/C mosaic genome. *J Clin Virol* 32:257-258.
106. **Cecilia, D., S. S. Kulkarni, S. P. Tripathy, R. R. Gangakhedkar, R. S. Paranjape, and D. A. Gadkari.** 2000. Absence of coreceptor switch with disease progression in human immunodeficiency virus infections in India. *Virology* 271:253-258.
107. **Cleghorn, F. R., Jackson, N., Carr, J. K., Edwards, J., Mahabir, B., Sill, A., et al.** 2000. A distinctive clade B HIV type 1 is heterosexually transmitted in Trinidad and Tobago. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:10532-10537.
108. **Coelho, H., Perdoná, GC., Neves, FR., and Passos, AD.** 2007. HIV prevalence and risk factors in a Brazilian penitentiary. *Cadernos de Saúde Pública*, 2007, 23:2197-2204.
109. **Coffin, J.** 1995. HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis and therapy. *Science* 267:483-489.
110. **Cohen, M., Hellman, N., Levy, J., DeCock, K., and Lange, J.** 2008. The spread, treatment, and prevention of HIV-1: evolution of a global pandemic. *The Journal of Clinical Investigation*. Vol 118, Nº 4:1244-1254.
111. **Collins-Fairclough, A. M., M. Charurat, Y. Nadai, M. Pando, M. M. Avila, W. A. Blattner, and J. K. Carr.** 2011. Significantly longer envelope V2 loops are characteristic of heterosexually transmitted subtype B HIV-1 in Trinidad. *PLoS One* 6:e19995.
112. **Conroy, S. A., Laeyendecker, O., Redd, A. D., Collinson-Streng, A., Kong, X., Makumbi, F., et al.** 2010. Changes in the distribution of HIV type 1 subtypes D and A in Rakai District, Uganda between 1994 and 2002. *AIDS Res Hum Retroviruses* 26:1087-1091.
113. **Coplan, P. M., Gupta, S. B., Dubey, S. A., Pitisuttithum, P., Nikas, A., Mbwewe, B., et al.** 2005. Cross-reactivity of anti-HIV-1 T cell immune responses among the major HIV-1 clades in HIV-1-positive individuals from 4 continents. *J Infect Dis* 191:1427-1434.
114. **Corbet, S., Müller-Trutwin, MC., Versmisse, P., Delarue, S., Ayoub, A., Lewis, J., et al.** 2000. env sequences of simian immunodeficiency viruses from chimpanzees in Cameroon are strongly related to those of human immunodeficiency virus group N from the same geographic area. *J. Virol.* 74:529-534.
115. **Craig, J. K., B. Zhang, S. Barnes, T. L. Tagmyer, S. J. Cook, C. J. Issel, and R. C. Montelaro.** 2007. Envelope variation as a primary determinant of lentiviral vaccine efficacy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:15105-15110.
116. **Cranston, K. A., and B. Rannala.** 2007. Summarizing a posterior distribution of trees using agreement subtrees. *Syst Biol* 56:578-590.

117. **Cuevas, M., Ruibal, I., Villahermosa, M.L., Díaz, H., Delgado, E., Vázquez de Parga, E., et al.** 2002. High HIV-1 genetic diversity in Cuba. *AIDS*. 16:1643-1653.
118. **Currier, J. R., Downing, W. E., Wasunna, K. M., Alam, U., Mason, C. J., Robb, M. L., et al.** 2003. Detection of high frequencies of HIV-1 cross-subtype reactive CD8 T lymphocytes in the peripheral blood of HIV-1-infected Kenyans. *Aids* 17:2149-2157.
119. **Charpentier, C., T. Nora, O. Tenaillon, F. Clavel, and A. J. Hance.** 2006. Extensive recombination among human immunodeficiency virus type 1 quasiespecies makes an important contribution to viral diversity in individual patients. *J Virol* 80:2472-2482.
120. **Cheng-Mayer, C., Seto, D., Tateno, M., and Levy, JA.** 1988. Biological features of HIV-1 that correlate with virulence in the host. *Science*. 240:80-82.
121. **Chohan, B. H., A. Piantadosi, and J. Overbaugh.** 2010. HIV-1 superinfection and its implications for vaccine design. *Curr HIV Res* 8:596-601.
122. **Daugherty, M. D., D. S. Booth, B. Jayaraman, Y. Cheng, and A. D. Frankel.** 2010. HIV Rev response element (RRE) directs assembly of the Rev homooligomer into discrete asymmetric complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:12481-12486.
123. **de Arazosa, H., Joanes, J., Lounes, R., Legeai, C., Clémenson, S., Pérez, J., and Auvert, B.** 2007. The HIV/AIDS epidemic in Cuba: description and tentative explanation of its low HIV prevalence. *BMC Infectious Diseases*, 2007, 7:130.
124. **de Brito, A., S. C. Komninakis, P. Novoa, R. M. de Oliveira, L. A. Fonseca, A. J. Duarte, and J. Casseb.** 2006. Women infected with HIV type 1 Brazilian variant, subtype B (B'-GWGR motif) have slower progression to AIDS, compared with patients infected with subtype B (B-GPGR motif). *Clin Infect Dis* 43:1476-1481.
125. **de Oliveira, T., Deforche, K., Cassol, S., Salminen, M., Paraskevis, D., Seebregts, C., et al.** 2005. An automated genotyping system for analysis of HIV-1 and other microbial sequences. *Bioinformatics* 21:3797-3800.
126. **de Roda Husma, A., Blaak, H., Brower, M., and Schuitemaker, H.** 1999. CCR5 cell-surface expression in relation to CCR5 genotype and the clinical course of HIV-1 infection. *J Immunol*. 163:4597-4603.
127. **de Sa-Filho, D. J., S. Soares Mda, V. Candido, L. H. Gagliani, E. Cavaliere, R. S. Diaz, and M. M. Caseiro.** 2008. HIV type 1 pol gene diversity and antiretroviral drug resistance mutations in Santos, Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 24:347-353.
128. **De Sa Filho, D. J., M. C. Suppirita, M. M. Caseiro, E. C. Sabin o, R. S. Diaz, and L. M. Janini.** 2006. Identification of two HIV type 1 circulating recombinant forms in Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 22:1-13.
129. **Delatorre, E. O., G. Bello, W. A. Eyer-Silva, S. L. Chequer-Fernandez, M. G. Morgado, and J. C. Couto-Fernandez.** 2011. Evidence of Multiple Introductions and Autochthonous Transmission of the HIV Type 1 CRF02\_AG Clade in Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 28:1369-1372.

130. **Delgado, E., Ampofo, W. K., Sierra, M., Torpey, K., Perez-Alvarez, L., Bonney, E. Y., et al.** 2008. High prevalence of unique recombinant forms of HIV-1 in Ghana: molecular epidemiology from an antiretroviral resistance study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 48:599-606.
131. **Delgado, E., Leon-Ponte, M., Villahermosa, M. L., Cuevas, M. T., Deibis, L., Echeverria, G., et al.** 2001. Analysis of HIV type 1 protease and reverse transcriptase sequences from Venezuela for drug resistance-associated mutations and subtype classification: a UNAIDS study. *AIDS Res Hum Retroviruses* 17:753-758.
132. **Delgado, E., M. Rios, J. Fernandez, L. Perez-Alvarez, R. Najera, and M. M. Thomson.** 2010. Identification of a new HIV type 1 BF intersubtype circulating recombinant form (CRF44\_BF) in Chile. *AIDS Res Hum Retroviruses* 26:821-826.
133. **Delgado, E., Thomson, MM., and Nájera, R.** 2002. La evolución del virus del sida. *Mundo científico. Sumario* 240. Nov. 68-75.
134. **Delgado, E., Thomson, MM., Villahermosa, ML., Sierra, M., Ocampo, A., Miralles, C., et al.** 2002. Identification of a newly characterized HIV-1 BG intersubtype circulating recombinant form in Galicia, Spain, which exhibits a pseudotype-like virion structure. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002. 29(5): 536-543.
135. **Delgado, R.** 2011. [Virological characteristics of HIV]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 29:58-65.
136. **Desai, M., G. Iyer, and R. K. Dikshit.** 2012. Antiretroviral drugs: critical issues and recent advances. *Indian J Pharmacol* 44:288-298.
137. **Deshpande, A., Jauvin, V., Magnin, N., Pinson, P., Faure, M., Masquelier, B., et al.** 2007. Resistance mutations in subtype C HIV type 1 isolates from Indian patients of Mumbai receiving NRTIs plus NNRTIs and experiencing a treatment failure: resistance to AR. *AIDS Res Hum Retroviruses* 23:335-340.
138. **Diallo, K., Murillo, W. E., de Rivera, I. L., Albert, J., Zhou, Z., Nkengasong, J., et al.** 2012. Comparison of HIV-1 resistance profiles in plasma RNA versus PBMC DNA in heavily treated patients in Honduras, a resource-limited country. *Int J Mol Epidemiol Genet* 3:56-65.
139. **Díaz, R., Pardini, R., Catroxo, M., Operskalski, EA., Mosley, JW., and Busch, MP.** 2005. HIV superinfection is not a common event. *J Clin Virol.* 33:328-330.
140. **Díaz, R., Sabino, EC., Mayer, A., Mosley, JW., and Busch, MP.** 1995. Dual human immunodeficiency virus type 1 infection and recombination in a dually exposed transfusion recipient. *J Virol.* 69: 3273-3281.
141. **DíazGranados, C. A., M. Mantilla, and W. Lenis.** 2010. Antiretroviral drug resistance in HIV-infected patients in Colombia. *Int J Infect Dis* 14:e298-303.
142. **Dieudonne, M., Garzaro, D., Torres, J., Naranjo, L., Suarez, J. A., Castro, J., et al.** 2006. High prevalence of secondary resistance mutations in Venezuelan HIV-1 isolates. *Invest Clin* 47:27-34.
143. **Dilernia, D. A., A. M. Gomez, L. Lourtau, R. Marone, M. H. Losso, H. Salomon, and M. Gomez-Carrillo.** 2007. HIV type 1 genetic diversity surveillance among newly diagnosed individuals from 2003 to 2005 in Buenos Aires, Argentina. *AIDS Res Hum Retroviruses* 23:1201-1207.



144. **Doherty, K. M., P. Nakka, B. M. King, S. Y. Rhee, S. P. Holmes, R. W. Shafer, and M. L. Radhakrishnan.** 2011. A multifaceted analysis of HIV-1 protease multidrug resistance phenotypes. *BMC Bioinformatics* 12:477.
145. **Domingo, E., Escarmís, C., Menéndez-Arias, L., and Holland, J.** 1999. Viral quasispecies and fitness variations. En: *Origin and Evolution of Viruses*. Esteban Domingo, Robert Webster, John Holland. Academic Press, USA.
146. **Domingo, E., Martin, V., Perales, C., Grande-Pérez, A., García-Arriaza, J., and Arias, A.** 2006. Viruses as quasispecies: biological implications. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 299:51-82.
147. **Domingo, E., Menéndez-Arias, L., and Holland, J.** 1997. RNA virus fitness. *Medical Virology*. Vol 7:87-96.
148. **Doualla-Bell, F., Avalos, A., Bretnner, B., Gaolathe, T., Mine, M., Gaseitsiwe, S., et al.** 2006. High prevalence of the K65R mutation in human immunodeficiency virus type 1 subtype C isolates from infected patients in Botswana treated with didanosine-based regimens. *Antimicrob Agents Chemother* 50:4182-4185.
149. **Doualla-Bell, F., Avalos, A., Gaolathe, T., Mine, M., Gaseitsiwe, S., Ndwapi, N., et al.** 2006. Impact of human immunodeficiency virus type 1 subtype C on drug resistance mutations in patients from Botswana failing a nelfinavir-containing regimen. *Antimicrob Agents Chemother* 50:2210-2213.
150. **Dowling, W., Kim, B., Mason, C.J., Wasunna, K.M., Alam, U., Elson, L., et al.** 2002. Forty-one near full-length HIV-1 sequences from Kenya reveal an epidemic of subtype A and A-containing recombinants. *AIDS*. 16:1809-1820.
151. **Drummond, A. J., Shih-Y. Ho, M. J. Phillips, and A. Rambaut.** 2006. Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biol* 4:e88.
152. **Drummond, A. J., and A. Rambaut.** 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol* 7:214.
153. **Drummond, A. J., and M. A. Suchard.** 2008. Fully Bayesian tests of neutrality using genealogical summary statistics. *BMC Genet* 9:68.
154. **Dube, M., M. G. Beggs, C. Paquay, and E. A. Cohen.** 2010. Modulation of HIV-1-host interaction: role of the Vpu accessory protein. *Retrovirology* 7:114.
155. **Dube, M., B. B. Roy, P. Guiot-Guilain, J. Binette, J. Mercier, A. Chiasson, and E. A. Cohen.** 2010. Antagonism of tetherin restriction of HIV-1 release by Vpu involves binding and sequestration of the restriction factor in a perinuclear compartment. *PLoS Pathog* 6:e1000856.
156. **Dykes, C., Balakrishnan, M., Piantanelli, V., Zhu, Y., Bambara, R.A., and Demeter, L.M.** 2004. Identification of a preferred region for recombination and mutation in HIV-1 gag. *Virology*. 2:262-279.
157. **Easterbrook, P. J., Smith, M., Mulle, J., O'Shea, S., Chrystie, I., de Ruiter, A., et al.** 2010. Impact of HIV-1 viral subtype on disease progression and response to antiretroviral therapy. *J Int AIDS Soc* 13:4.
158. **Engelman, A., and P. Cherepanov.** 2012. The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. *Nat Rev Microbiol* 10:279-290.

159. **Escoto-Delgadillo, M., Vazquez-Valls, E., Ramirez-Rodriguez, M., Corona-Nakamura, A., Amaya-Tapia, G., Quintero-Perez, N., et al.** 2005. Drug-resistance mutations in antiretroviral-naïve patients with established HIV-1 infection in Mexico. *HIV Med* 6:403-409.
160. **Eshleman, S. H., Becker-Pergola, G., Deseyve, M., Guay, L. A., Mracna, M., Fleming, T., et al.** 2001. Impact of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) subtype on women receiving single-dose nevirapine prophylaxis to prevent HIV-1 vertical transmission (HIV network for prevention trials 012 study). *J Infect Dis* 184:914-917.
161. **Eshleman, S. H., Hackett, J., Jr., Swanson, P., Cunningham, S. P., Drews, B., Brennan, C., et al.** 2004. Performance of the Celera Diagnostics ViroSeq HIV-1 Genotyping System for sequence-based analysis of diverse human immunodeficiency virus type 1 strains. *J Clin Microbiol* 42:2711-2717.
162. **Eshleman, S. H., Hoover, D. R., Chen, S., Hudelson, S. E., Guay, L. A., Mwatha, A., et al.** 2005. Nevirapine (NVP) resistance in women with HIV-1 subtype C, compared with subtypes A and D, after the administration of single-dose NVP. *J Infect Dis* 192:30-36.
163. **Eshleman, S. H., Hoover, D. R., Chen, S., Hudelson, S. E., Guay, L. A., Mwatha, A., et al.** 2005. Resistance after single-dose nevirapine prophylaxis emerges in a high proportion of Malawian newborns. *Aids* 19:2167-2169.
164. **Esteves, A., Parreira, R., Piedade, J., Venenno, T., Franco, M., Germano de Sousa, J., et al.** 2003. Spreading of HIV-1 subtype G and envB/gagG recombinant strains among injecting drug users in Lisbon, Portugal. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 19:511-517.
165. **Esteves, A., Parreira, R., Venenno, T., Franco, M., Piedade, J., Germano De Sousa, J., and Canas-Ferreira, WF.** 2002. Molecular epidemiology of HIV-1 type 1 infection in Portugal: high prevalence of non-B subtypes. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 18:313-325.
166. **Eyer-Silva, W. A., and M. G. Morgado.** 2007. Autochthonous horizontal transmission of a CRF02\_AG strain revealed by a human immunodeficiency virus type 1 diversity survey in a small city in inner state of Rio de Janeiro, Southeast Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102:809-815.
167. **Eyzaguirre, L., Bautista, C. T., Ayala, C., Acosta, J., Negrete, M., Saterén, W. B., et al.** 2006. First case of HIV Type 1 subtype F among men who have sex with men in Colombia. *AIDS Res Hum Retroviruses* 22:808-811.
168. **Fan, J., M. Negroni, and D. L. Robertson.** 2007. The distribution of HIV-1 recombination breakpoints. *Infect. Genet. Evol.* 7:717-723.
169. **Figueroa, J.** 2008. The HIV epidemic in the Caribbean: meeting the challenges of achieving universal access to prevention, treatment and care. *West Indian Medical Journal*, 2008, 57:195-203.
170. **Fourati, S., Malet, I., Binka, M., Boukobza, S., Wirden, M., Sayon, S., et al.** 2010. Partially active HIV-1 Vif alleles facilitate viral escape from specific antiretrovirals. *AIDS* 24:2313-2321.
171. **Frankel, A. D., and J. A. Young.** 1998. HIV-1: fifteen proteins and a RNA. *Annu. Rev. Biochem.* 67:1-25.

172. **Freed, E., and Martin, MA.** 2007. HIVs and their replication. In: Fields Virology (5th ed.). New York: Lippincott:p. 2107–2186.
173. **Frentz, D., C. A. Bo ucher, and D. A. va n de Vijve r.** 2012. Temporal changes in the epidemiology of transmission of drug-resistant HIV-1 across the world. *AIDS Rev* 14:17-27.
174. **Friedman-Kien, A. E., Laubenstein, L. J., Rubinstein, P., Buimovici-Klein, E., Marmor, M., Stahl, R., et al.** 1982. Disseminated Kaposi's sarcoma in homosexual men. *Ann Intern Med* 96:693-700.
175. **Galetto, R., Moume n, A., Giacomoni, V., Veron, M., Charneau, P., and Negr oni, M.** 2004. The structure of HIV-1 genomic RNA in the gp120 gene determines a recombination hot spot in vivo. *J Biol Chem.* 279(35):36625-36632.
176. **Gallo, R. C.** 2001. Investigación sobre el VIH/SIDA: algunas perspectivas del pasado y algunos retos para el futuro. En: Salud pública y SIDA. Francisco Bueno Cañigral y Rafael Nájera Morrondo. Ediciones Doyma, S. L. Madrid. España.
177. **Gallo, R. C., and Montagnier, L.** 2003. The discovery of HIV as the cause of AIDS. *N ENGL J MED* 349:24:2283-2285.
178. **Gallo, R. C., Salahuddin, S. Z., P opovic, M., Shearer, G. M., Kaplan, M., Hay nes, B. F., et al.** 1984. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* 224:500-503.
179. **Ganser-Pornillos, B. K., M. Yeager, and W. I. Sundquist.** 2008. The structural biology of HIV assembly. *Curr Opin Struct Biol* 18:203-217.
180. **Gao, F., Bailes, E., Robertson, DL., Chen, Y., Rodenbur g, CM., Michael, SF., et al.** 1999. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes*. *Nature.* 397:436-441.
181. **Gao, F., C hen, Y., Levy , DM., Co nway, JA., Kepler, TB., and Hui, H.** 2004. Unselected mutations in the human immunodeficiency virus type 1 genome are mostly nonsynonymous and often deleterious. *J Virol.* 78:2426-2433.
182. **Gao, F., Robertson, DL., Morrison, SG., Hui, H., Craig, S., Decker, J., et al.** 1996. The heterosexual human immunodeficiency virus type 1 epidemic in Thailand is caused by an intersubtype (A/E) recombinant of African origin. *J Virol.* 70:7013-7029.
183. **García-Martínez, L., and García-Mart ínez, J. V.** 1999. Molecular Biology. En: Encyclopedia of Virology. Second Edition. Volume Two. Allan Cranoff y Robert Webster. Academic Press, San Diego, California, USA.
184. **Geijtenbeek, T., Torensma, R., van Vliet, SJ., van Duijnhoven, GC., Adema, GC., van Koo yk, Y., et al.** 2000. Identification of DC-sign, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 100:575-585.
185. **Gifford, R. J., de Oliveira, T., Ra mbaut, A., Py bus, O. G., Du nn, D., Vandamme, A. M., et al.** 2007. Phylogenetic surveillance of viral genetic diversity and the evolving molecular epidemiology of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 81:13050-13056.
186. **Gilbert, M., Thomas, P., Rambaut, A., Wlasiuk, G., Spira, T. J., Pitchenik, A. E., and Worobey , M.** 2007. The emergence of HIV/AIDS in the Americas and beyond. *PNAS.* 104(31),18566-18570.

187. **Gilbert, P. B., McKeague, I. W., Eisen, G., Mullins, C., Gueye, NDiaye A., et al.** 2003. Comparison of HIV-1 and HIV-2 infectivity from a prospective cohort study in Senegal. *Stat Med* 22:573-593.
188. **Girard, M., L. Yue, F. Barre-Sinoussi, E. van der Ryst, B. Meignier, E. Muchmore, and P. N. Fultz.** 1996. Failure of a human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) subtype B-derived vaccine to prevent infection of chimpanzees by an HIV-1 subtype E strain. *J Virol* 70:8229-8233.
189. **Gittens, M. V., W. W. Roth, T. Roach, H. G. Stringer, Jr., D. Pieniazek, V. C. Bond, and P. N. Levett.** 2003. The molecular epidemiology and drug resistance determination of HIV type 1 subtype B infection in Barbados. *AIDS Res Hum Retroviruses* 19:313-319.
190. **Gomez-Carrillo, M., S. Pampuro, A. Duran, M. Losso, D. R. Harris, and J. S. Read, et al.** 2006. Analysis of HIV type 1 diversity in pregnant women from four Latin American and Caribbean countries. *AIDS Res Hum Retroviruses* 22:1186-1191.
191. **Gottlieb, G. S., Nickle, D. C., Jensen, M. A., Wong, K. G., Grobler, J., Li, F., et al.** 2004. Dual HIV-1 infection associated with rapid disease progression. *Lancet* 363:619-622.
192. **Gottlieb, M. S., R. Schroff, H. M. Schanker, J. D. Weisman, P. T. Fan, R. A. Wolf, and A. Saxon.** 1981. Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med* 305:1425-1431.
193. **Graf, T., C. P. Passaes, L. G. Ferreira, E. C. Gr isard, M. G. Morgado, G. Bello, and A. R. Pinto.** 2011. HIV-1 genetic diversity and drug resistance among treatment naive patients from Southern Brazil: an association of HIV-1 subtypes with exposure categories. *J Clin Virol* 51:186-191.
194. **Grobler, J., Gray, C. M., Rademey er, C., Seoighe, C., Ramjee, G., Karim, S. A., et al.** 2004. Incidence of HIV-1 dual infection and its association with increased viral load set point in a cohort of HIV-1 subtype C-infected female sex workers. *J Infect Dis* 190:1355-1359.
195. **Gross, L., Porco, TC., and Grant, RM.** 2004. HIV-1 superinfection and viral diversity. *AIDS*. 18:1513-1520.
196. **Grossman, Z., Istom in, V., Averbuc h, D., Lorber, M., Risenberg, K., Levi, I., et al.** 2004. Genetic variation at NNRTI resistance-associated positions in patients infected with HIV-1 subtype C. *Aids* 18:909-915.
197. **Grossman, Z., Paxinos, E. E., Aver buch, D., Maay an, S., Parkin, N. T., Engelhard, D., et al.** 2004. Mutation D30N is not preferentially selected by human immunodeficiency virus type 1 subtype C in the development of resistance to nelfinavir. *Antimicrob Agents Chemother* 48:2159-2165.
198. **Guimaraes, M. L., W. A. Eyer-Silva, J. C. Couto-Fernandez, and M. G. Morgado.** 2008. Identification of two new CRF\_BF in Rio de Janeiro State, Brazil. *Aids* 22:433-435.
199. **Guimaraes, M. L., K. G. Velarde-D unois, D. Seg urondo, and M. G. Morgado.** 2012. The HIV-1 epidemic in Bolivia is dominated by subtype B and CRF12\_BF "family" strains. *Virol J* 9:19.

200. **Gupta, R. K., I. L. Chrystie, S. O'Shea, J. E. Mullen, R. Kulasegaram, and C. Y. Tong.** 2005. K65R and Y181C are less prevalent in HAART-experienced HIV-1 subtype A patients. *Aids* 19:1916-1919.
201. **Hahn, B., Shaw, GM., De Cock, KM., and Sharp, PM.** 2000. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science*. 287: 607-614.
202. **Halperin., D., de Moy a, EA., Pérez-Then, E., Pappas, G., and Garcia Calleja, JM.** 2009. Understanding the HIV epidemic in the Dominican Republic: a prevention success story in the Caribbean? *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 2009, 51(Suppl. 1):S52–S59.
203. **Hall, B. G., and M. Barlo w.** 2006. Phylogenetic analysis as a tool in molecular epidemiology of infectious diseases. *Ann Epidemiol* 16:157-169.
204. **Hall., H., An, Q., Hu tchinson, AB., and Sansom, S.** 2008. Estimating the lifetime risk of a diagnosis of the HIV infection in 33 states, 2004–2005. *Journal of Acquired Immune Defi ciency Syndromes*, 2008, 49:294–297.
205. **Hall., H., Song, R., Rhodes, P., Prejean, J., An, Q., Lee, LM., et al. HIV Incidence Surveillance Group.** 2008. Estimation of HIV incidence in the United States. *Journal of the American Medical Association*, 2008, 300:520–529.
206. **Hamilton, C. L., L. M. Ey zaguirre, Amarakoon, Il, P. Figu eroa, J. Duncan, J. K. Carr, and M. E. Ro ye.** 2012. Analysis of protease and reverse transcriptase genes of HIV for antiretroviral drug resistance in Jamaican adults. *AIDS Res Hum Retroviruses* 28:923-927.
207. **Hammer, S., Saag, MS., Schechter, M., Montaner, J., Schooley, RT., Jacobsen, DM., et al.** 2006. Treatment for adult HIV infection. *JAMA*. 296:827-843.
208. **Harris, M., Ser wadda, D., Se wankambo, N., Kim, B., Kigozi, G., Kiwanuka, N., et al.** 2002. Among 46 near full length HIV type genome sequences from Rakai District, Uganda, subtype D and AD recombinants predominate. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 18:1281-1290.
209. **Harrison, G. P., Mayo, M.S., Hunter, E., and Lever, AM.** 1998. Pausing of reverse transcriptasa on retroviral RNA templates is influenced by secondary structures both 5' and 3' of the catalytic site. *Nucleic Acids Res*. 26:3433-3442.
210. **Hemelaar, J.** 2012. The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. *Trends Mol Med* 18:182-192.
211. **Hemelaar, J., E. Go uws, P. D. Ghy s, and S. Osm anov.** 2011. Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000-2007. *AIDS* 25:679-689.
212. **Herschhorn, A., and A. Hizi.** 2010. Retroviral reverse transcriptases. *Cell Mol Life Sci* 67:2717-2747.
213. **Heslop, O. D., Smikle, M. F., Deer, D ., Christian, N. A., Vickers, I. E., Harvey, K. M., et al.** 2005. Human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) subtypes in Jamaica. *West Indian Med J* 54:279-282.
214. **Heslop, O. D., Smikle, M. F., V ickers, I. E., Christian, N. A., Harvey, K. M., Fig ueroa, J. P., et al.** 2009. High genetic diversity in human immunodeficiency virus-type 1 in Jamaica. *West Indian Med J* 58:195-200.

215. **Hierholzer, J., Montano, S., Hoelscher, M., Negret, M., Hierholzer, M., Avila, M. M., et al.** 2002. Molecular Epidemiology of HIV Type 1 in Ecuador, Peru, Bolivia, Uruguay, and Argentina. *AIDS Res Hum Retroviruses* 18:1339-1350.
216. **Hillis, D., and Bull, JJ.** 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Sys Biol.* 42:152-160.
217. **Hoelscher, M., Kim, B., Maboko, L., Mhalu, F., von Sonnerburg, F., Birx, DL., et al.** 2001. High proportion of unrelated HIV-1 intersubtype recombinants in the Mbeya region of southwest Tanzania. *AIDS* 2001. 15:1461-1470.
218. **Holder, M., and Lewis, Paul.** 2003. Phylogeny estimation: traditional and Bayesian approaches. *Nature Reviews / Genetics*. Volume 4, April, 275-283.
219. **Holguin, A., Erazo, K., Escobar, G., de Mulder, M., Yebra, G., Martin, L., et al.** 2011. Drug resistance prevalence in human immunodeficiency virus type 1 infected pediatric populations in Honduras and El Salvador during 1989-2009. *Pediatr Infect Dis J* 30:e82-87.
220. **Hosseini, M., van Oosterhout, JJ., Weigel, R., Nelson, J., Fiscus, S., Eron, J., and Kumwenda, J.** 2008. Resistance profile of patients failing first line ART in Malawi when using clinical and immunologic monitoring. *AIDS 2008 – XVII International AIDS Conference: Mexico City, Mexico* 2008.
221. **Hsu, L. Y., R. Subramaniam, L. Bacheler, and N. I. Paton.** 2005. Characterization of mutations in CRF01\_AE virus isolates from antiretroviral treatment-naïve and -experienced patients in Singapore. *J Acquir Immune Defic Syndr* 38:5-13.
222. **Hu, D. J., A. Buve, J. Baggs, G. van der Groen, and T. J. Dondero.** 1999. What role does HIV-1 subtype play in transmission and pathogenesis? An epidemiological perspective. *Aids* 13:873-881.
223. **Hu, D. J., Vanichseni, S., Mastro, T. D., Raktham, S., Young, N. L., Mock, P. A., et al.** 2001. Viral load differences in early infection with two HIV-1 subtypes. *Aids* 15:683-691.
224. **Huang, K. J., and D. P. Wooley.** 2005. A new cell-based assay for measuring the forward mutation rate of HIV-1. *J Virol Methods* 124:95-104.
225. **Huang, W., Eshleman, S. H., Toma, J., Fransen, S., Stawiski, E., Paxinos, E. E., et al.** 2007. Coreceptor tropism in human immunodeficiency virus type 1 subtype D: high prevalence of CXCR4 tropism and heterogeneous composition of viral populations. *J Virol* 81:7885-7893.
226. **Hue, S., J. P. Clewley, P. A. Cane, and D. Pillay.** 2005. Investigation of HIV-1 transmission events by phylogenetic methods: requirement for scientific rigour. *Aids* 19:449-450.
227. **Huelsenbeck, J. P., and Ronquist, F.** 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17:754-755.
228. **Hungnes, O., Jonassen, TO., Jonassen, CM., and Grinde, B.** 2000. Molecular epidemiology of viral infections. *APMIS*. 108(2):81-97.
229. **Jeeninga, R. E., M. Hoogenkamp, M. Armand-Ugon, M. de Baar, K. Verhoef, and B. Berkhout.** 2000. Functional differences between the

- long terminal repeat transcriptional promoters of human immunodeficiency virus type 1 subtypes A through G. *J Virol* 74:3740-3751.
230. **Jern, P., R. A. Russell, V. K. Pathak, and J. M. Coffin.** 2009. Likely role of APOBEC3G-mediated G-to-A mutations in HIV-1 evolution and drug resistance. *PLoS Pathog.* 5:e1000367.
  231. **Jetzt, A., Yu, H., Klarmann, GJ., Ron, Y., Preston, BD., and Dougherty, JP.** 2000. High rate of recombination throughout the human immunodeficiency virus type 1 genome. *J Virol* 74:1234-1240.
  232. **Johnson, J. A., Li, J. F., Wei, X., Lipscomb, J., Irlbeck, D., Craig, C., et al.** 2008. Minority HIV-1 drug resistance mutations are present in antiretroviral treatment-naïve populations and associate with reduced treatment efficacy. *PLoS Med* 5:e158.
  233. **Johnson, V. A., Brun-Vezinet, F., Clotet, B., Gunthard, H. F., Kuritzkes, D. R., Pillay, D., et al.** 2008. Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1. *Top HIV Med* 16:138-145.
  234. **Johnston, E. R., L. S. Zijenah, S. Mutetwa, R. Kantor, C. Kittinunvorakoon, and D. A. Katzenstein.** 2003. High frequency of syncytium-inducing and CXCR4-tropic viruses among human immunodeficiency virus type 1 subtype C-infected patients receiving antiretroviral treatment. *J Virol* 77:7682-7688.
  235. **Jonassen, T., Stene-Johansen, K., Berg, ES., Hungnes, O., Lindboe, CF., Froland, SS., and Grinde, B.** 1997. Sequence analysis of HIV-1 group O from Norwegian patients infected in the 1960s. *Virology* 231(1):43-47.
  236. **Jost, S., Bernard, MC., Kaiser, L., Yerly, S., Hirschel, B., Samri, A., et al.** 2002. A patient with HIV-1 superinfection. *NEJM*. 347:731-736.
  237. **Jung, A., Marier, R., Vartanian, JP., Bocharov, G., Jung, V., Fischer, U., et al.** 2002. Multiply infected spleen cells in HIV patients. *Nature*. 418(6894):144.
  238. **Junqueira, D. M., R. M. de Medeiros, M. C. Matte, L. A. Araujo, J. A. Chies, P. Ashton-Prolla, and S. E. Almeida.** 2011. Reviewing the history of HIV-1: spread of subtype B in the Americas. *PLoS One* 6:e27489.
  239. **Kaleebu, P., French, N., Mahe, C., Yirrell, D., Watera, C., Lyagoba, F. et al.** 2002. Effect of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 envelope subtypes A and D on disease progression in a large cohort of HIV-1-positive persons in Uganda. *J Infect Dis* 185:1244-1250.
  240. **Kaleebu, P., Nankya, I. L., Yirrell, D. L., Shafer, L. A., Kyosiimire-Lugemwa, J., Lule, D. B. et al.** 2007. Relation between chemokine receptor use, disease stage, and HIV-1 subtypes A and D: results from a rural Ugandan cohort. *J Acquir Immune Defic Syndr* 45:28-33.
  241. **Kalyanaraman, V. S., M. G. Sarngadharan, M. Robert-Guroff, I. Miyoshi, D. Golde, and R. C. Gallo.** 1982. A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. *Science* 218:571-573.
  242. **Kanki, P. J., Travers, K. U., M. Boup S., Hsieh, C. C., Marlink, R. G., Gueye, N., et al.** 1994. Slower heterosexual spread of HIV-2 than HIV-1. *Lancet* 343:943-946.

243. **Kantor, R.** 2006. Impact on HIV-1 pol diversity on drug resistance and its clinical implications. *Curr Opin Infect Dis.* 19:594-606.
244. **Kantor, R., Katzenstein, D. A., Efron, B., Carvalho, A. P., Wynhoven, B., Cane, P., et al.** 2005. Impact of HIV-1 subtype and antiretroviral therapy on protease and reverse transcriptase genotype: results of a global collaboration. *PLoS Med* 2:e112.
245. **Keele, B., Giorgi, E. E., Salazar- Gonzalez, JF., Decker, JM., Pham, KT., Salazar, M G., et al.** 2008. Identification and characterization of transmitted and early founder virus envelopes in primary HIV-1 infection. *Proc. Natl Acad. Sci U. S. A* 105:7552-7557.
246. **Keele, B. F., Van Heuverswyn, F., Li, Y., Bailes, E., Takehisa, J., Santiago, ML., et al.** 2006. Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. *Science* 313:523-526.
247. **Kijak, G., and McCutchan, F.** 2005. HIV diversity, molecular epidemiology, and the role of recombination. *Current Inf Dis Reports* 7:480-488.
248. **Kim, E., Bhattacharya, T., Kunstman, K., Swantek, P., Konings, FA., Malim, MH., and Wolinsky, SM.** 2010. Human APOBEC3G-mediated editing can promote HIV-1 sequence diversification and accelerate adaptation to selective pressure. *J Virol* 84:10402-10405.
249. **Kis, O., Robillard, K., Chan, G., and Bendayan, R.** 2010. The complexities of antiretroviral drug-drug interactions: role of ABC and SLC transporters. *Trends in Pharmacological Sciences.* 2010. 31(1):22-35.
250. **Kivela, P. S., Krol, A., Salminen, M. O., Geskus, R. B., Suni, J. I., Anttila, V. J., et al.** 2005. High plasma HIV load in the CRF01-AE outbreak among injecting drug users in Finland. *Scand J Infect Dis* 37:276-283.
251. **Kiwanuka, N., Laeyendecker, O., Quinn, T. C., Wawer, M. J., Shepherd, J., Robb, M., et al.** 2009. HIV-1 subtypes and differences in heterosexual HIV transmission among HIV-discordant couples in Rakai, Uganda. *Aids* 23:2479-2484.
252. **Kiwanuka, N., Laeyendecker, O., Robb, M., Kigozi, G., Arroyo, M., McCutchan, F., et al.** 2008. Effect of human immunodeficiency virus Type 1 (HIV-1) subtype on disease progression in persons from Rakai, Uganda, with incident HIV-1 infection. *J Infect Dis* 197:707-713.
253. **Konings, F. A., S. T. Burda, M. M. Urbanski, P. Zhong, A. Nadas, and P. N. Nyambi.** 2006. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) circulating recombinant form 02\_AG (CRF02\_AG) has a higher in vitro replicative capacity than its parental subtypes A and G. *J Med Virol* 78:523-534.
254. **Koot, M., Keet, IPM., Vos, AHV., de Goede, R., Roos, MTL., Coutinho, RA., et al.** 1993. Prognostic value of human immunodeficiency virus type 1 biological phenotype for rate of CD4 cell depletion and progression to AIDS. *Ann Intern Med.* 118:681-688.
255. **Korber, B., Gaschen, K. Yusim, R. Thakallapally, C. Kesmir, and V. Detours.** 2001. Evolutionary and immunological implications of contemporary HIV-1 variation. *Br Med Bull* 58:19-42.
256. **Kosakovsky Pond, S. L., Posada, D., Stawiski, E., Chappley, C., Poon, A. F., Hughes, G., et al.** 2009. An evolutionary model-based



- algorithm for accurate phylogenetic breakpoint mapping and subtype prediction in HIV-1. *PLoS Comput Biol* 5:e1000581.
257. **Kostrikis, L. G., Y. Cao, H. Ngai, J. P. Moore, and D. D. Ho.** 1996. Quantitative analysis of serum neutralization of human immunodeficiency virus type 1 from subtypes A, B, C, D, E, F, and I: lack of direct correlation between neutralization serotypes and genetic subtypes and evidence for prevalent serum-dependent infectivity enhancement. *J Virol* 70:445-458.
  258. **Koulinska, I. N., E. Villamor, G. Msamanga, W. Fawzi, J. Blackard, B. Renjifo, and M. Essex.** 2006. Risk of HIV-1 transmission by breastfeeding among mothers infected with recombinant and non-recombinant HIV-1 genotypes. *Virus Res* 120:191-198.
  259. **Kouri, V., Aleman, Y., Perez, L., Perez, J., Fonseca, C., Correa, C., et al.** 2012. High frequency of antiviral drug resistance and non-B subtypes in HIV-1 patients failing antiviral therapy in Cuba. *J Clin Virol* 55:348-355.
  260. **Kuiken, C. L., G. Zwart, E. Baan, R. A. Coutinho, J. A. van den Hoek, and J. Goudsmit.** 1993. Increasing antigenic and genetic diversity of the V3 variable domain of the human immunodeficiency virus envelope protein in the course of the AIDS epidemic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:9061-9065.
  261. **Kuritzkes, D. R., Grant, R. M., Feorino, P., Gr iswold, M., Hoover, M., Young, R., et al.** 2003. Performance characteristics of the TRUGENE HIV-1 Genotyping Kit and the Opengene DNA Sequencing System. *J Clin Microbiol* 41:1594-1599.
  262. **Kwon, J. A., Yoon, S. Y., Lee, C. K ., Lim, C. S., Lee, K. N., Sung, H. J., et al.** 2006. Performance evaluation of three automated human immunodeficiency virus antigen-antibody combination immunoassays. *J Virol Methods* 133:20-26.
  263. **Lama, J., Mangasarian, A., and Tr onzo, D.** 1999. Cell-surface expression of CD4 reduces HIV-1 infectivity by blocking env incorporation in a nef and vpu inhibitable manner. *Curr Biol* 9:622-631.
  264. **Lama, J. R., Sanchez, J., Suarez , L., Caballero, P., Laguna, A., Sanchez, J. L., et al.** 2006. Linking HIV and antiretroviral drug resistance surveillance in Peru: a model for a third-generation HIV sentinel surveillance. *J Acquir Immune Defic Syndr* 42:501-505.
  265. **Lara, C., Sallberg, M., Johansson, B ., Johansson, B., de Rivera, IL., and Sönnernborg, A** 1997. The Honduran Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) epidemic is dominated by HIV-1 subtype B as determined by V3 domain sero- and genotyping. *J Clin Microbiol.* 35:783-784.
  266. **Larkin, M. A., Blackshields, G. , Brow n, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., et al.** 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics.* 23, 2947-2948.
  267. **Lederman, M., Penn-Nicholson, A., Cho, M., and Mosier, D.** 2006. Biology of CCR5 and its role in HIV infection and treatment. *JAMA*, August 16, vol 296, N° 7, 815-826.
  268. **Leitner, T., and Albert, J .** 1999. The molecular clock of HIV-1 unveiled through analysis of a known transmission history. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:10752-10757.

269. **Lemieux, A. M., Pare, M. E., Audebert, B., Legault, E., Lefort, S., Boucher, N., et al.** 2004. T-cell activation leads to poor activation of the HIV-1 clade E long terminal repeat and weak association of nuclear factor-kappaB and NFAT with its enhancer region. *J Biol Chem* 279:52949-52960.
270. **Levy, D., Aldrovandri, G., Kutsch, O., and Shaw, GM.** 2004. Dynamics of HIV-1 recombination in its natural target cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101:4204-4209.
271. **Levy, J. A.** 1993. Pathogenesis of Human Immunodeficiency Virus Infection. *Microbiological Reviews*. Mar. 183-289.
272. **Lewis, F., G. J. Hughes, A. Rambaut, A. Pozniak, and A. J. Leigh Brown.** 2008. Episodic sexual transmission of HIV revealed by molecular phylodynamics. *PLoS Med* 5:e50.
273. **Li, M., Salazar-Gonzalez, J. F., Derdeyn, C. A., Morris, L., Williamson, C., Robinson, J. E., et al.** 2006. Genetic and neutralization properties of subtype C human immunodeficiency virus type 1 molecular env clones from acute and early heterosexually acquired infections in Southern Africa. *J Virol* 80:11776-11790.
274. **Li, Y., K. K. Tee, H. Liao, S. Hase, R. Uenishi, and X. J. Li, et al.** 2010. Identification of a novel second-generation circulating recombinant form (CRF48\_01B) in Malaysia: a descendant of the previously identified CRF33\_01B. *J Acquir Immune Defic Syndr* 54:129-136.
275. **Liu, J., A. Bartesaghi, M. J. Borgnia, G. Sapiro, and S. Subramaniam.** 2008. Molecular architecture of native HIV-1 gp120 trimers. *Nature* 455:109-113.
276. **Loemba, H., Brenner, B., Parniak, M. A., Ma'ayan, S., Spira, B., Moisi, D., et al.** 2002. Genetic divergence of human immunodeficiency virus type 1 Ethiopian clade C reverse transcriptase (RT) and rapid development of resistance against nonnucleoside inhibitors of RT. *Antimicrob Agents Chemother* 46:2087-2094.
277. **Lole, K. S., Bollinger, R.C., Paranjape, R.S., Gadkaeri, D., Kulkarni, S.S., Novak, N.G., et al.** 1999. Full length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *J Virol*. 73, 152-160.
278. **Lloyd, B., O'Connell, R. J., Michael, N. L., Aviles, R., Palou, E., Hernandez, R., et al.** 2008. Prevalence of resistance mutations in HIV-1-Infected Hondurans at the beginning of the National Antiretroviral Therapy Program. *AIDS Res Hum Retroviruses* 24:529-535.
279. **Machado, L. F., Ishak, M. O., Vallinoto, A. C., Lemos, J. A., Azevedo, V. N., Moreira, M. R., et al.** 2009. Molecular epidemiology of HIV type 1 in northern Brazil: identification of subtypes C and D and the introduction of CRF02\_AG in the Amazon region of Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 25:961-966.
280. **Machado, L. Y., Blanco, M., Dubed, M., Diaz, H. M., Ruiz, N. M., Valdes, N., et al.** 2012. HIV type 1 genetic diversity in newly diagnosed Cuban patients. *AIDS Res Hum Retroviruses* 28:956-960.
281. **Machado, L. Y., Dubed, M., Diaz, H., Ruiz, N., Romay, D., Valdes, N., et al.** 2013. Transmitted HIV type 1 drug resistance in newly diagnosed Cuban patients. *AIDS Res Hum Retroviruses* 29:411-414.

282. **Magiorkinis, G., Paraskevis, D., Vandinamme, AM., Magiorkinis, E., Sypsa, V., and Hatzakis, A.** 2003. In vivo characteristics of human immunodeficiency virus type 1 intersubtype recombination: determination of hot spots and correlation with sequence similarity. *J Gen Virol* 84:2715-2722.
283. **Mamadou, S., Vidal, N., Montavon, C., Ben, A., Djibo, A., Rabiou, S., et al.** 2003. Emergence of complex and diverse CRF02\_AG/CRF06\_cpx recombinant HIV type 1 strains in Niger, West Africa. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 19:77-82.
284. **Mammano, F., Trouplin, V., Zennou, V., and Clavel, F.** 2000. Retracing the evolutionary pathways of human immunodeficiency virus type 1 resistance to protease inhibitors: virus fitness in the absence and in the presence of drug. *J Virol* 74:8524-8531.
285. **Manigart, O., Courgnaud, V., Sanou, O., Válea, D., Nagot, N., Meda, N. et al.** 2004. Clade B HIV-1 superinfection with wild-type virus after primary infection with drug-resistant clade B virus. *AIDS*. 18:1645-1651.
286. **Mansky, L. M.** 1996. Forward mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 in a T lymphoid cell line. *AIDS Res Hum. Retroviruses* 12:307-314.
287. **Mansky, L. M., and H. M. Temin.** 1995. Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase. *J Virol* 69:5087-5094.
288. **Marechal, V., Prevost, MC., Petit, C., Perret, E., Heard, JM., and Schwartz, O.** 1995. Human immunodeficiency type 1 Nef increases the efficiency of reverse transcription in the infected cell. *J Virol*. 69:4053-4059.
289. **Marlink, R., Kanki, P., Thior, I., Travers, K., Eisen, G., Siby, T., et al.** 1994. Reduced rate of disease development after HIV-2 infection as compared to HIV-1. *Science* 265:1587-1590.
290. **Martin, D. P., P. Lemey, and D. Posada.** 2011. Analysing recombination in nucleotide sequences. *Mol Ecol Resour* 11:943-955.
291. **Martinez-Cajas, J. L., N. P. Pai, M. B. K lein, and M. A. Wainberg.** 2009. Differences in resistance mutations among HIV-1 non-subtype B infections: a systematic review of evidence (1996-2008). *J Int AIDS Soc* 12:11.
292. **Martinez-Picado, J., A. V. Savara, L. Shi, L. Sutton, and R. T. D'Aquila.** 2000. Fitness of human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor-selected single mutants. *Virology* 275:318-322.
293. **Mas, A., C. López-Galíndez, I. Cacho, J. Gómez, and M. A. Martínez.** 2010. Unfinished stories on viral quasispecies and Darwinian views of evolution. *J Mol. Biol.* 397:865-877.
294. **Mascola, J. R., Louwagie, J., McCutchan, F. E., Fischer, C. L., Hegerich, P. A., Wagner, K. F., et al.** 1994. Two antigenically distinct subtypes of human immunodeficiency virus type 1: viral genotype predicts neutralization serotype. *J Infect Dis* 169:48-54.
295. **McCutchan, F.** 2006. Global epidemiology of HIV. *Journal of Medical Virology*. 78:S7-S12.
296. **McCutchan, F.** 2000. Understanding the genetic diversity of HIV-1. *AIDS*. 14: S31-44.

297. **McCutchan, F., Carr, JK., Bajani, M., Sanders-Buell, E., Harr y, TO., Stoeckli, TC., et al.** 1999. Subtype G and multiple forms of A/G intersubtype recombinant human immunodeficiency virus type 1 in Nigeria. *Virology*. 254:226-234.
298. **McCutchan, F., Carr, JK., Murphy, D., Piyasirisilp, S., Gao, F., Hahn, B., et al.** 2002. Precise mapping of recombination breakpoints suggests a common parent of two BC recombinant HIV type 1 strains circulating in China. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 18:1135-1140.
299. **McKinnon, L. R., Ball, T. B., Kima ni, J., Wachihi, C., Matu, L., Luo, M., et al.** 2005. Cross-clade CD8(+) T-cell responses with a preference for the predominant circulating clade. *J Acquir Immune Defic Syndr* 40:245-249.
300. **Medrano, L., Pérez, L., and Cuevas, L.** 2001. Patogenia de la infección por el VIH-1. En: *Salud pública y SIDA*. Francisco Bueno Cañigral y Rafael Nájera Morondo. Ediciones Doyma, S. L. Madrid. España.
301. **Mehle, A., Strack, B., Ancuta, P., Zhang, C., McPike, M., and Gabuzda, D.** 2004. Vif overcomes the innate antiviral activity of APOBEC3G by promoting its degradation in the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* 279(9):7792-7798.
302. **Meloni, S., Kim, B., Sankale, JL., Hamel, DJ., Tovanabutra, S., Mboup, S., et al.** 2004. Distinct human immunodeficiency virus type 1 subtype A virus circulating in West Africa: sub-subtype A3. *J Virol*. 78(22):12438-12445.
303. **Mellors, J. W., C. R. Rinaldo., P. Gupta., R. M. White., J. A. Todd., and L. A. Kingsley .** 1996. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science*. 272:1167-1170.
304. **Miller, M., Warmerdam, MT., Page, KA., Feinberg, MB., and Greene, WC.** 1995. Expression of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) nef gene during HIV-1 production increases progeny particle infectivity independently of gp160 or viral entry. *J Virol* 69:579-584.
305. **Miller, V.** 2001. Interpretation of resistance assay results. *Antiviral Therapy*. 6:1-9.
306. **Montagnier., L.** 1999. Human Immunodeficiency viruses (Retroviridae). En: *Encyclopedia of Virology*. Second Edition. Volume Two. Allan Cranoff y Robert Webster. Academic Press, San Diego, California, USA.
307. **Montano, M. A., C. P. Nixon, T. Ndung'u, H. Bussmann, V. A. Novitsky, D. Dickman, and M. Essex.** 2000. Elevated tumor necrosis factor-alpha activation of human immunodeficiency virus type 1 subtype C in Southern Africa is associated with an NF-kappaB enhancer gain-of-function. *J Infect Dis* 181:76-81.
308. **Montano, M. A., Nixon, C. P., and Essex, M.** 1998. Dysregulation through the NF-kappaB enhancer and TATA box of the human immunodeficiency virus type 1 subtype E promoter. *J Virol* 72:8446-8452.
309. **Montano, M. A., V. A. Novitsky, J. T. Blackard, N. L. Cho, D. A. Katzenstein, and M. Essex.** 1997. Divergent transcriptional regulation among expanding human immunodeficiency virus type 1 subtypes. *J Virol* 71:8657-8665.
310. **Montano, S. M., Sanchez, J. L., Laguna-Torres, A., Cuchi, P., Avila, M. M., Weissenbacher, M., et al.** 2005. Prevalences, genotypes, and

- risk factors for HIV transmission in South America. *J Acquir Immune Defic Syndr* 40:57-64.
311. **Montavon, C., Toue-Kane, C., Liegeois, F., Mpoudi, E., Bourgeois, A., Vergne, L., et al.** 2000. Most env and gag subtype A HIV-1 viruses circulating in west and west-central Africa are similar to the prototype AG recombinant virus IbNG. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 23:363-374.
  312. **Monteiro, J. P., L. C. Alcantara, T. de Oliveira, A. M. Oliveira, M. A. Melo, C. Brites, and B. Galvão-Castro.** 2009. Genetic variability of human immunodeficiency virus-1 in Bahia state, Northeast, Brazil: high diversity of HIV genotypes. *J Med Virol* 81:391-399.
  313. **Moore, J. P., S. G. Kitchen, P. Pugach, and J. A. Zack.** 2004. The CCR5 and CXCR4 coreceptors--central to understanding the transmission and pathogenesis of human immunodeficiency virus type 1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 20:111-126.
  314. **Mostowy, R., R. D. Kouyos, D. Fouchet, and S. Bonhoeffer.** 2011. The role of recombination for the coevolutionary dynamics of HIV and the immune response. *PLoS. One*. 6:e16052.
  315. **Moutouh, L., J. Corbeil, and D. D. Richman.** 1996. Recombination leads to the rapid emergence of HIV-1 dually resistant mutants under selective drug pressure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93:6106-6111.
  316. **Murillo, W., de Rivera, I. L., Parham, L., Jovel, E., Palou, E., Karlsson, A. C., and Albert, J.** 2010. Prevalence of drug resistance and importance of viral load measurements in Honduran HIV-infected patients failing antiretroviral treatment. *HIV Med* 11:95-103.
  317. **Murillo, W., Paz-Bailey, G., Morales, S., Monterroso, E., Paredes, M., Dobbs, T., et al.** 2010. Transmitted drug resistance and type of infection in newly diagnosed HIV-1 individuals in Honduras. *J Clin Virol* 49:239-244.
  318. **Murillo, W., Veras, N., Prosperi, M., de Rivera, I. L., Paz-Bailey, G., Morales-Miranda, S., et al.** 2013. A single early introduction of HIV-1 subtype B into Central America accounts for most current cases. *J Virol* 87:7463-7470.
  319. **Myatt, M., and D. E. Bennett.** 2008. A novel sequential sampling technique for the surveillance of transmitted HIV drug resistance by cross-sectional survey for use in low resource settings. *Antivir Ther* 13 Suppl 2:37-48.
  320. **Myers, J. E., Taylor, B. S., Rojas Fermin, R. A., Reyes, E. V., Vaughan, C., Jose, L., et al.** 2011. Transmitted drug resistance among antiretroviral-naïve patients with established HIV type 1 infection in Santo Domingo, Dominican Republic and review of the Latin American and Caribbean literature. *AIDS Res Hum Retroviruses* 28:667-674.
  321. **Nadai, Y., Eyzaguirre, L. M., Sill, A., Cleghorn, F., Nolte, C., Charurat, M., et al.** 2009. HIV-1 epidemic in the Caribbean is dominated by subtype B. *PLoS One* 4:e4814.
  322. **Nájera, I., Holguín, A., Quiñones-Mateu, ME., Muñoz-Fernández, MA., Nájera, R., López-Galíndez, C., and Domingo, E.** 1995. Pol gene quasiespecies of human immunodeficiency virus: mutations associated with drug resistance in virus from patients undergoing no drug therapy. *J. Virol.* 69:23-31.

323. **Najera, I., Richman, DD., Olivares, I., Rojas, JM., Peinado, MA., Peruchó, M., et al.** 1994. Natural occurrence of drug resistance mutations in the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1 isolates. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 10(11):1479-1488.
324. **Nájera Morrondo, R.** 2001. Origen de la pandemia. En: Salud pública y SIDA. Francisco Bueno Cañigral y Rafael Nájera Morrondo. Ediciones Doyma, S. L. Madrid. España.
325. **Nájera, R., Delgado, E., Pérez-Álvarez, L., and Thomson, MM.** 2002. Genetic recombination and its role in the development of the HIV-1 pandemic. *AIDS* 16 (suppl4):S3-S16.
326. **Najera, R., E., Delgado, L., Perez-Alvarez, and MM., Thomson.** 2005. El papel de la recombinación genética en el desarrollo de la pandemia del SIDA. *Investig. Clin. Farm.* vol 2 (1): 09-22.
327. **Nakahara, K., Wakasa-Morimoto, C., Kobayashi, M., Mi ki, S., Noshi, T., Seki, T., et al.** 2009. Secondary mutations in viruses resistant to HIV-1 integrase inhibitors that restore viral infectivity and replication kinetics. *Antiviral Res* 81:141-146.
328. **Neher, R. A., and T., Leitner.** 2010. Recombination rate and selection strength in HIV intra-patient evolution. *PLoS. Comput. Biol.* 6:e1000660.
329. **Neil, S. J., T. Zang, and P. D. Bieniasz.** 2008. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature* 451:425-430.
330. **Nijhuis, M., Schuurman, R., de Jong, D., Erickson, J., Gustchina, E., Albert, J., et al.** 1999. Increased fitness of drug resistant HIV-1 protease as a result of acquisition of compensatory mutations during suboptimal therapy. *Aids* 13:2349-2359.
331. **Nisole, S., and A. Saib.** 2004. Early steps of retrovirus replicative cycle. *Retrovirology* 1:9.
332. **Njai, H. F., Gali, Y., Vanham, G., Cl ybergh, C., Jennes, W., Vidal, N. et al.** 2006. The predominance of Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1) circulating recombinant form 02 (CRF02\_AG) in West Central Africa may be related to its replicative fitness. *Retrovirology* 3:40.
333. **Nora, T., Charpentier, C., Tenailon, O., Hoede, C., Clavel, F., and Hance, AJ.** 2007. Contribution of recombination to the evolution of human immunodeficiency viruses expressing resistance to antiretroviral treatment. *J Virol* 81:7620-7628.
334. **O'Donovan, D., Ariyoshi, K., Milligan, P., Ota, M., Yamuah, L., Sarge-Njie, R., and Whitt le, H.** 2000. Maternal plasma viral RNA levels determine marked differences in mother-to-child transmission rates of HIV-1 and HIV-2 in The Gambia. MRC/Gambia Government/University College London Medical School working group on mother-child transmission of HIV. *Aids* 14:441-448.
335. **Oelrichs, R. B., and S. M. Crowe .** 2003. The molecular epidemiology of HIV-1 in South and East Asia. *Curr. HIV. Res* 1:239-248.
336. **Ohagen, A., Devitt , A., Kun stman, KJ., Gorry , PR., Rose, PP., Korber, B., et al.** 2003. Genetic and functional analysis of full-length human immunodeficiency virus type 1 env genes derived from brain and blood patients with AIDS. *J Virol.* 22:12336-12345.
337. **Orrell, C., R. P. Wale nsky, E. Losina, J. Pitt, K. A. Freedberg, and R. Wood.** 2009. HIV type-1 clade C resistance genotypes in treatment-

- naive patients and after first virological failure in a large community antiretroviral therapy programme. *Antivir Ther* 14:523-531.
338. **Page, R. D. M.** 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*. 12: 357-358.
  339. **Palma, A. C., K. Covens, J. S. noeck, A. M. Vandamm e, R. J. Camacho, and K. V an Laethem.** 2012. HIV-1 protease mutation 82M contributes to phenotypic resistance to protease inhibitors in subtype G. *J Antimicrob Chemother* 67:1075-1079.
  340. **Pando, M. A., Gome z-Carrillo, M., Vignoles, M., Ru bio, A. E., dos Ramos Farias, M. S., Vila, M ., et al.** 2011. Incidence of HIV type 1 infection, antiretroviral drug resistance, and molecular characterization in newly diagnosed individuals in Argentina: A Global Fund Project. *AIDS Res Hum Retroviruses* 27:17-23.
  341. **Parham, L., de Rivera, I. L., Mur illo, W., Naver, L., Largaespada, N., Albert, J., and Karlsson, A. C** 2011. Short communication: high prevalence of drug resistance in HIV type 1-infected children born in Honduras and Belize 2001 to 2004. *AIDS Res Hum Retroviruses* 27:1055-1059.
  342. **Patterson, T., Semple, S.J., St aines, H., Lozada, R., Orozovich, P., Bucardo, J., et al.** 2008. Prevalence and correlates of HIV infection among female sex workers in 2 Mexico-US border cities. *Journal of Infectious Diseases*, 2008, 197:728–732.
  343. **Peeters, M., Esu-Williams, E., Ve rgne, L., Mon tavon, C., Mulanga-Kabeya, C., Harry , T., et al.** 2000. Predominance of subtype A and G HIV type 1 in Nigeria, with geographical differences in their distribution. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 16:315-325.
  344. **Peeters, M., Toure-Kane, C., and Nkengasong, JN.** 2003. Genetic diversity of HIV in Africa: impact on diagnosis, treatment, vaccine development and trials. *AIDS*. 17: 2547-2560.
  345. **Peeters, M., Vincent, R., Perret, J. L., Lasky, M ., Patrel, D., Liegeois, F., et al.** 1999. Evidence for differences in MT2 cell tropism according to genetic subtypes of HIV-1: syncytium-inducing variants seem rare among subtype C HIV-1 viruses. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 20:115-121.
  346. **Perelson, A. S., Neumann, A.U., Markowitz, M., Leonard, JM., and Ho, DD.** 1996. HIV dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science*. 271:1582-1586.
  347. **Perez-Alvarez, L., Mu noz, M., Delgado, E., Miralles, C., Ocampo, A., Garcia, V., et al.** 2006. Isolation and biological characterization of HIV-1 BG intersubtype recombinants and other genetic forms circulating in Galicia, Spain. *J Med Virol* 78:1520-1528.
  348. **Pérez-Álvarez, L., Muñoz-Nieto, M ., Delgado, E., Casado, G., Sierra, M., Carmona, R., et al.** 2005. Biological phenotype of HIV-1 BG recombinants and other genetic forms from Galicia, Spain. 3rd IAS Conference on Pathogenesis and Treatment. Presentación oral Mo0a0405. Río de Janeiro, Brasil. 24-27 julio 2005.
  349. **Perez-Alvarez, L., Thomson, M. M ., Bleda, M. J., Aragones, C., Gonzalez, Z., Perez, J., et al.** 2006. HIV Type 1 molecular epidemiology in Cuba: high genetic diversity, frequent mosaicism, and recent

- expansion of BG intersubtype recombinant forms. *AIDS Res Hum Retroviruses* 22:724-733.
350. **Perez-Alvarez, L., Thomson, M. M., Villahermosa, M. L., de Parga, E. V., Rodriguez, A., Cuevas, M. T., et al.** 2001. HIV-1 subtype G and BG recombinant viruses in Spanish natives: evidence of characteristic mutations in reverse transcriptase and protease. *Aids* 15:1907-1910.
  351. **Pérez-Alvarez, L., Vázquez de Parga, E., Carmona, R., Muñoz Nieto-Sandoval, M., and Nájera Morrondo, R.** Drogas frente al virus del SIDA. 50 *Mundo Científico* 245. Saberes de Virología.
  352. **Perez-Alvarez, L. P., Carmona, R., Aragones, C., Delgado, E., Thomson, M. M., Gonzalez, Z., et al.** 2007. Genotypic resistance to antiretroviral drugs in patients infected with several HIV type 1 genetic forms in Cuba. *AIDS Res Hum Retroviruses* 23:407-414.
  353. **Perez-Losada, M., D. V. Jobes, F. Sinangil, K. A. Crandall, D. Posada, and P. W. Berman.** 2010. Phylodynamics of HIV-1 from a phase-III AIDS vaccine trial in North America. *Mol Biol Evol* 27:417-425.
  354. **Pérez, L., Correa, C., Campos, Y. A., Gonzalez, I., Perez, J., Martinez, P. A., et al.** 2011. Drug-resistant HIV-1 in Cuban children and their seropositive mothers. *MEDICC Rev* 13:24-31.
  355. **Perrin, L., Kaiser, L., and Yerly, S.** 2003. Travel and the spread of HIV-1 genetic variants. *Lancet*. (3): 22-27.
  356. **Petroni, A., Deluchi, G., Pryluka, D., Rotryng, F., Bortolozzi, R., Lopardo, G., et al.** 2006. Update on primary HIV-1 resistance in Argentina: emergence of mutations conferring high-level resistance to nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors in drug-naïve patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 42:506-510.
  357. **Piantadosi, A., B. Chohan, V. Chohan, R. S. McClelland, and J. Overbaugh.** 2007. Chronic HIV-1 infection frequently fails to protect against superinfection. *PLoS Pathog* 3:e177.
  358. **Pillay, V., C. Pillay, R. Kantor, F. Venter, L. Levin, and L. Morris.** 2008. HIV type 1 subtype C drug resistance among pediatric and adult South African patients failing antiretroviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses* 24:1449-1454.
  359. **Pineda-Peña, A. C., D. C. Bello, O. Sussmann, A. M. Vandamme, J. Vercauteren, K. van Laethem, and A. Gomez-Lopez.** 2012. HIV-1 transmitted drug resistance in Latin America and the Caribbean: what do we know? *AIDS Rev* 14:256-267.
  360. **Ping, L. H., Nelson, J. A., Hoffman, I. F., Schock, J., Lamers, S. L., Goodman, M., et al.** 1999. Characterization of V3 sequence heterogeneity in subtype C human immunodeficiency virus type 1 isolates from Malawi: underrepresentation of X4 variants. *J Virol* 73:6271-6281.
  361. **Piyasirisilp, S., McCutchan, FE., Carr, JK., Sanders-Buell, E., Liu, W., Chen, J., et al.** 2000. A recent outbreak of human immunodeficiency virus type 1 infection in southern China was initiated by two highly homogeneous, geographically separated strains, circulating recombinant form AE and a novel BC recombinant. *J Virol*. 74:11286-11295.
  362. **Plantier, J. C., Leoz, M., Dickerson, JE., De Oliveira, F., Cordonnier, F., Lemée, V., et al.** 2009. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat. Med* 15:871-872.



363. **Poiesz, B. J., F. W. Ruscetti, A. F. Gazdar, P. A. Bunn, J. D. Minna, and R. C. Gallo.** 1980. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77:7415-7419.
364. **Poiesz, B. J., F. W. Ruscetti, M. S. Reitz, V. S. Kalyanaraman, and R. C. Gallo.** 1981. Isolation of a new type C retrovirus (HTLV) in primary uncultured cells of a patient with Sezary T-cell leukaemia. *Nature* 294:268-271.
365. **Pomerantz, R. J., and Horn, D. L.** 2003. Twenty years of therapy for HIV-1 infection. *Nat Med* 9:867-873.
366. **Pommier, Y., A. A. Johnson, and C. Marchand.** 2005. Integrase inhibitors to treat HIV/AIDS. *Nat Rev Drug Discov* 4:236-248.
367. **Popovic, M., P. S. Sarin, M. Robert-Gurroff, V. S. Kalyanaraman, D. Mann, J. Minnowada, and R. C. Gallo.** 1983. Isolation and transmission of human retrovirus (human t-cell leukemia virus). *Science* 219:856-859.
368. **Popovic, M., M. G. Sarngadharan, E. Read, and R. C. Gallo.** 1984. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* 224:497-500.
369. **Popper, S. J., A. D. Sarr, K. U. Travers, A. Gueye-Ndiaye, S. Mboup, M. E. Essex, and P. J. Kanki.** 1999. Lower human immunodeficiency virus (HIV) type 2 viral load reflects the difference in pathogenicity of HIV-1 and HIV-2. *J Infect Dis* 180:1116-1121.
370. **Pybus, O. G., and Rambaut, A.** 2009. Evolutionary analysis of the dynamics of viral infectious disease. *Nat Rev Genet* 10:540-550.
371. **Quiñones-Mateu, M.** 2005. Is HIV-1 evolving to a less virulent (pathogenic) virus?. *AIDS*. 19:1689-1690.
372. **Quivy, V., Adam, E., Collette, Y., Demonte, D., Chariot, A., Vanhulle, C., et al.** 2002. Synergistic activation of human immunodeficiency virus type 1 promoter activity by NF-kappaB and inhibitors of deacetylases: potential perspectives for the development of therapeutic strategies. *J Virol* 76:11091-11103.
373. **Raboni, S. M., Almeida, S. M., Rotta, I., Ribeiro, C. E., Rosario, D., Vidal, L. R., et al.** 2010. Molecular epidemiology of HIV-1 clades in Southern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105:1044-1049.
374. **Rambaut, A., D. Posada, K. A. Crandall, and E. C. Holmes.** 2004. The causes and consequences of HIV evolution. *Nat Rev Genet* 5:52-61.
375. **Ramirez, B. C., Simon-Loriere, E., Galetto, R., and Negroni, M.** 2008. Implications of recombination for HIV diversity. *Virus Research*. Vol 134:64-73.
376. **Ramos, A., Hu, DJ., Nguyen, L., Phan, KO., Vanichseni, S., Promadej, N., et al.** 2002. Intersubtype human immunodeficiency virus type 1 superinfection following seroconversion to primary infection in two injection drug users. *J Virol*. 76:7444-7452.
377. **Ramratnam, B., Bonhoeffer, S., Binley, J., Hurley, A., Zhang, L., Mittler, JE., et al.** 1999. Rapid production and clearance of HIV-1 and hepatitis C virus assessed by large volume plasma apheresis. *Lancet* 354:1782-1785.
378. **Rangel, H. R., D. Garzaro, C. R. Gutierrez, L. Vasquez, G. Guillen, J. R. Torres, and F. H. Pujol.** 2009. HIV diversity in Venezuela:

- predominance of HIV type 1 subtype B and genomic characterization of non-B variants. *AIDS Res Hum Retroviruses* 25:347-350.
379. **Renjifo, B., Blackard, J. T., Klaskala, W., Chaplin, B. R., Shah, P., McLane, M. F., et al.** 1999. HIV-1 subtype B in Honduras. *Virus Res* 60:191-197.
  380. **Renjifo, B., Chung, P., Gilbert, D. M., Wakagile, G., Msamanga, W., Fawzi, and M. Essex.** 2003. In-utero transmission of quasiespecies among human immunodeficiency virus type 1 genotypes. *Virology* 307:278-282.
  381. **Renjifo, B., Fawzi, W., Wakagile, D., Hunter, D., Msamanga, G., Spiegelman, D., et al.** 2001. Differences in perinatal transmission among human immunodeficiency virus type 1 genotypes. *J Hum Virol* 4:16-25.
  382. **Renjifo, B., Gilbert, P., Haplin, B., Vannberg, F., Wakagile, D., Msamanga, G., et al.** 1999. Emerging recombinant human immunodeficiency viruses: uneven representation of the envelope V3 region. *AIDS* 13:1613-1621.
  383. **Resh, M. D.** 2005. Intracellular trafficking of HIV-1 Gag: how Gag interacts with cell membranes and makes viral particles. *AIDS Rev* 7:84-91.
  384. **Revilla, A., Delgado, E., Christian, E. C., Dalrymple, J., Vega, Y., Carrera, C., et al.** 2011. Construction and phenotypic characterization of HIV type 1 functional envelope clones of subtypes G and F. *AIDS Res Hum Retroviruses* 27:889-901.
  385. **Rhee, S. Y., Fessel, W. J., Liu, T. F., Marlowe, N. M., Rowland, C. M., Rode, R. A., et al.** 2009. Predictive value of HIV-1 genotypic resistance test interpretation algorithms. *J Infect Dis* 200:453-463.
  386. **Rhee, S. Y., Gonzales, M.J., Kantor, R., Betts, B. J., Ravela, J., and Shafer, R.W.** 2003. Human immunodeficiency virus reverse transcriptase and protease sequence database. *Nucl Acids Res.* 31, 298-303.
  387. **Rhee, S. Y., Kantor, R., Katzenstein, D. A., Camacho, R., Morris, L., Sirivichayakul, S., et al.** 2006. HIV-1 pol mutation frequency by subtype and treatment experience: extension of the HIVseq program to seven non-B subtypes. *Aids* 20:643-651.
  388. **Rhee, S. Y., Taylor, J., Fessel, W. J., Kaufman, D., Towner, W., Troia, P., et al.** 2010. HIV-1 protease mutations and protease inhibitor cross-resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 54:4253-4261.
  389. **Ribera, E., Tuset, M., Martínez, M., and del Cacho, E.** 2011. Características de los fármacos antirretrovirales. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 29(5):362-391.
  390. **Rinke de Wit, T. F., Tsegaye, A., Wolday, D., Hailu, B., Akililu, M., Sanders, E., et al.** 2002. Primary HIV-1 subtype C infection in Ethiopia. *J Acquir Immune Defic Syndr* 30:463-470.
  391. **Rios, M., Delgado, E., Perez-Alvarez, L., Fernandez, J., Galvez, P., de Parga, E. V., et al.** 2007. Antiretroviral drug resistance and phylogenetic diversity of HIV-1 in Chile. *J Med Virol* 79:647-656.
  392. **Rios, M., Fernandez, J., Jaramillo, P., Paredes, V., Sanchez, J. L., Laguna-Torres, V. A., et al.** 2005. Molecular epidemiology of HIV type 1

- in Chile: differential geographic and transmission route distribution of B and F subtypes. *AIDS Res Hum Retroviruses* 21:835-840.
393. **Rios, M., C. Villanueva, C. San Martin, and E. Ramirez.** 2003. [Identification of B and F human immunodeficiency virus subtypes in Chilean patients]. *Rev Med Chil* 131:711-718.
  394. **Rivera-Morales, L. G., Novitsky, V. A., Trujillo, J. R., Lavalle-Montalvo, C., Cano-Dominguez, C., Ramos-Jimenez, J., et al.** 2001. The molecular epidemiology of HIV type 1 of men in Mexico. *AIDS Res Hum Retroviruses* 17:87-92.
  395. **Robertson, D., Anderson, JP., Bradac, JA., Carr, JK., Foley, B., Funkhouser, RK., et al.** 2000. HIV-1 nomenclature proposal. *Science*. Apr 7;288(5463):55-56.
  396. **Ronquist, F., and Huelsenbeck, J. P.** 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572-1574.
  397. **Ross, T., Oran, AE., and Cullen, BR.** 1999. Inhibition of HIV-1 progeny virion release by cell-surface CD4 is relieved by expression of the viral nef protein. *Curr Biol* 9:613-621.
  398. **Rouet, F., Foulongne, V., Viljoen, J., Steegen, K., Becquart, P., Valea, D., et al.** 2010. Comparison of the Generic HIV Viral Load assay with the Amplicor HIV-1 monitor v1.5 and Nuclisens HIV-1 EasyQ v1.2 techniques for plasma HIV-1 RNA quantitation of non-B subtypes: the Kesho Bora preparatory study. *J Virol Methods* 163:253-257.
  399. **Rousseau, C. M., L earn, G. H., Bhattacharya, T., Nickle, D. C., Heckerman, D., Chetty, S., et al.** 2007. Extensive intrasubtype recombination in South African human immunodeficiency virus type 1 subtype C infections. *J Virol* 81:4492-4500.
  400. **Roye, M. E., Amarakoon, II, C. L., Hamilton, L. M. Eyzaguirre, P. Figueroa, and J. K. Carr.** 2011. Genotypic characterization of HIV type 1 in Jamaica. *AIDS Res Hum Retroviruses* 27:91-95.
  401. **Ruchansky, D., C. Casado, J. C. Russi, J. R. Arbiza, and C. Lopez-Galindez.** 2009. Identification of a new HIV Type 1 circulating recombinant form (CRF38\_BF1) in Uruguay. *AIDS Res Hum Retroviruses* 25:351-356.
  402. **Sabido, M., Giardina, F., Hernández, G., Fernández, VH., Monzón, JE., Ortiz, R., et al. UALE team.** 2009. The UALE project: decline in the incidence of HIV and sexually transmitted infections and increase in the use of condoms among sex workers in Guatemala. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 2009, 51(Suppl. 1):S35-S41.
  403. **Sabino, E., Shpaer, EG., Morgado, MG., Korber, BT., Díaz, RS., and Bongertz, V.** 1994. Identification of human immunodeficiency virus type 1 envelope genes recombinant between subtypes B and F in two epidemiologically linked individuals from Brazil. *J Virol*. 68:6340-6346.
  404. **Sacktor, N., Nakasujja, N., Skolasky, R. L., Rezapour, M., Robertson, K., Musisi, S., et al.** 2009. HIV subtype D is associated with dementia, compared with subtype A, in immunosuppressed individuals at risk of cognitive impairment in Kampala, Uganda. *Clin Infect Dis* 49:780-786.
  405. **Sadler, H. A., M. D. Stenglein, R. S. Harris, and L. M. Mansky.** 2010. APOBEC3G contributes to HIV-1 variation through sublethal mutagenesis. *J Virol* 84:7396-7404.

406. **Salminen, M. O., J. K. Carr, D. S. Burke, and F. E. McCutchan.** 1995. Identification of breakpoints in intergenotypic recombinants of HIV type 1 by bootscanning. *AIDS Res Hum Retroviruses* 11:1423-1425.
407. **Sanabani, S. S., Pastena, E. R., da Costa, A. C., Martinez, V. P., Kleine-Neto, W., de Oliveira, A. C., et al.** 2011. Characterization of partial and near full-length genomes of HIV-1 strains sampled from recently infected individuals in Sao Paulo, Brazil. *PLoS One* 6:e25869.
408. **Sanchez, G. I., Bautista, C. T., Eyzaguirre, L., Carrion, G., Arias, S., Saterén, W. B., et al.** 2006. Molecular epidemiology of human immunodeficiency virus-infected individuals in Medellín, Colombia. *Am J Trop Med Hyg* 74:674-677.
409. **Sanchez, J., Lama, JR., Peinado, J., Paredes, A., Lucchetti, A., Russell, K., et al.** 2009. High HIV and ulcerative transmitted infection incidence estimates among men who have sex with men in Peru: awaiting an effective preventive intervention. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 2009, 51(Suppl. 1):S47–S51.
410. **Sanders-Buell, E., Saad, MD., Abed, AM., Bose, M., Todd, CS., Strathdee, SA., et al.** 2007. A nascent HIV type 1 epidemic among injecting drug users in Kabul, Afghanistan is dominated by complex AD recombinant strain, CRF35\_AD. *AIDS Res Hum. Retroviruses* 23:834-839.
411. **Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:5463-5467.
412. **Santoro-Lopes, G., Harrison, L. H., Tavares, M. D., Xexeo, A., Dos Santos, A. C., and Schechter, M.** 2000. HIV disease progression and V3 serotypes in Brazil: is B different from B-Br? *AIDS Res Hum Retroviruses* 16:953-958.
413. **Santos, A. F., and M. A. Soares.** 2010. HIV Genetic Diversity and Drug Resistance. *Viruses* 2:503-531.
414. **Santos, L. A., J. P. Monteiro-Cunha, A. F. Araujo, C. Brites, B. Galvao-Castro, and L. C. Alcantara.** 2011. Detection of distinct human immunodeficiency virus type 1 circulating recombinant forms in northeast Brazil. *J Med Virol* 83:2066-2072.
415. **Sarnadharan, M. G., M. Popovic, L. Bruch, J. Schupbach, and R. C. Gallo.** 1984. Antibodies reactive with human T-lymphotropic retroviruses (HTLV-III) in the serum of patients with AIDS. *Science* 224:506-508.
416. **Sarr, A. D., Eisen, G., Gueye-Ndiaye, A., Mullins, C., Traore, I., Dia, M. C., et al.** 2005. Viral dynamics of primary HIV-1 infection in Senegal, West Africa. *J Infect Dis* 191:1460-1467.
417. **Schriner, D., Rodrigo, AG., Nickle, DC., and Mullins, JI.** 2004. Pervasive genomic recombination of HIV-1 in vivo. *Genetics*. 167(4):1573-1583.
418. **Schuitmaker, H., Koot, M., Kootstra, NA., Dercksen, MW., de Goede, RE., van Steenwijk, RP., et al.** 1992. Biological phenotype of human immunodeficiency virus type 1 clones at different stages of infection: progression of disease is associated with a shift from monocytotropic to T-cell tropic population. *J Virol*. 66:1354-1360.
419. **Schupbach, J., M. Popovic, R. V. Gilden, M. A. Gonda, M. G. Sarnadharan, and R. C. Gallo.** 1984. Serological analysis of a

- subgroup of human T-lymphotropic retroviruses (HTLV-III) associated with AIDS. *Science* 224:503-505.
420. **Schwartz, O., V., Marechal, O., Danos, and JM., Herard.** 1995. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) *nef* increases the efficiency of reverse transcription in the infected cell. *J Virol* 69:4053-4059.
  421. **Seaman, M. S., Janes, H., Hawkins, N., Grandpre, L. E., Devoy, C., Giri, A., et al.** 2010. Tiered categorization of a diverse panel of HIV-1 Env pseudoviruses for assessment of neutralizing antibodies. *J Virol* 84:1439-1452.
  422. **Shankarappa, R., Gupta, P., Learn, G.H., Jr Rodrigo, A.G., Rinaldo, C.R., Jr Gorry, M.C., et al.** 1998. Evolution of human immunodeficiency virus type 1 envelope sequences in infected individuals with differing disease progression profiles. *Virology*. 241:251-259.
  423. **Shapiro, B., A. Rambaut, O. G. Pybus, and E. C. Holmes.** 2006. A phylogenetic method for detecting positive epistasis in gene sequences and its application to RNA virus evolution. *Mol Biol Evol* 23:1724-1730.
  424. **Sharp, P., and Hahn, B.** 2008. Prehistory of HIV-1. *Nature* 2;455(7213):605-606.
  425. **Sierra, M., Thomson, MM., Ríos, M., Casado, G., Castro, RO., Delgado, E., et al.** 2005. The analysis of near full-length genome sequences of human immunodeficiency virus type 1 BF intersubtype recombinant viruses from Chile, Venezuela, and Spain reveals their relationship to diverse lineages of recombinant viruses related to CRF12\_BF. *Infect Genet Evol.* 5:209-217.
  426. **Siliciano, J. D., and R. F. Siliciano.** 2004. A long-term latent reservoir for HIV-1: discovery and clinical implications. *J. Antimicrob. Chemother.* 54:6-9.
  427. **Silveira, J., Santos, A. F., Martinez, A. M., Goes, L. R., Mendes-Sassi, R., Muniz, C. P., et al.** 2012. Heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1 subtype C in southern Brazil. *J Clin Virol* 54:36-41.
  428. **Simek, M. D., Rida, W., Priddy, F. H., Pung, P., Carrow, E., Laufer, D. S., et al.** 2009. Human immunodeficiency virus type 1 elite neutralizers: individuals with broad and potent neutralizing activity identified by using a high-throughput neutralization assay together with an analytical selection algorithm. *J Virol* 83:7337-7348.
  429. **Singh, K., B. Marchand, K. A. Kirby, E. Michailidis, and S. G. Sarafianos.** 2010. Structural Aspects of Drug Resistance and Inhibition of HIV-1 Reverse Transcriptase. *Viruses* 2:606-638.
  430. **Skasko, M., A. Tokarev, C. C. Chen, W. B. Fischer, S. K. Pillai, and J. Guatelli.** 2011. BST-2 is rapidly down-regulated from the cell surface by the HIV-1 protein Vpu: evidence for a post-ER mechanism of Vpu-action. *Virology* 411:65-77.
  431. **Skasko, M., Wang, Y., Tian, Y., Tokarev, A., Munguia, J., Ruiz, A., et al.** 2012. HIV-1 Vpu protein antagonizes innate restriction factor BST-2 via lipid-embedded helix-helix interactions. *J Biol Chem* 287:58-67.
  432. **Smith, D., Richman, DD., and Little, SJ.** 2005. HIV superinfection. *J Infect Dis.* 192:438-444.

433. **Soares, M., De Oliveira, T., Brindeiro, RM., Díaz, RS., Sabino, EC., Brígido, L., et al.** 2003. A specific subtype C of human immunodeficiency virus type 1 circulates in Brazil. *AIDS*. 17:11-21.
434. **Soheilli, Z. S., Ataiee, Z., Tootian, S., Zadsar, M., Amini, S., Abadi, K., et al.** 2009. Presence of HIV-1 CRF35\_AD in Iran. *AIDS Res Hum. Retroviruses* 25:123-124.
435. **Solomon, S., Balakrishnan, P., Shetty, N., Cecelia, A., Madhavan, V., Ganesh, A et al.** 2007. Prevalence of Treatment Failure and Drug Resistance among Treatment-experienced HIV-1-infected Individuals at a Tertiary HIV Referral Center in South India. 14th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections: Los Angeles, CA 2007.
436. **Soto-Ramirez, L. E., Renjifo, B., Mc Lane, M. F., Marl ink, R., O'Hara, C., Sutthent, R., et al.** 1996. HIV-1 Langerhans' cell tropism associated with heterosexual transmission of HIV. *Science* 271:1291-1293.
437. **Soto, R. J., Ghee, A. E., Nunez, C. A., May orga, R., Tapia, K. A., Astete, S. G., et al.** 2007. Sentinel surveillance of sexually transmitted infections/HIV and risk behaviors in vulnerable populations in 5 Central American countries. *J Acquir Immune Defic Syndr* 46:101-111.
438. **Spira, S., M. A. Wainberg, H. Loe mba, D. Turner, and B. G. Brenner.** 2003. Impact of clade diversity on HIV-1 virulence, antiretroviral drug sensitivity and drug resistance. *J Antimicrob Chemother* 51:229-240.
439. **Srinivas, R., and F ridland, Arnold.** 1999. Antiretroviral agents. En: *Encyclopedia of Virology. Second Edition. Volume Two.* Allan Cranoff y Robert Webster. Academic Press, San Diego, California, USA.
440. **Stamatakis, A., Hoover, P., and Rou gemont, J.** 2008. A Rapid Bootstrap Algorithm for the RAxML Web-Servers. *Systematic Biology*. 75(5):758-771.
441. **Starcich, B. R., Hahn, B. H., Shaw, G. M., McNeely, P. D., Modrow, S., Wolf, H., et al.** 1986. Identification and characterization of conserved and variable regions in the envelope gene of HTLV-III/LAV, the retrovirus of AIDS. *Cell* 45:637-648.
442. **Strathdee, S., Lozada, R., Pollini, RA., Brouwer, KC., Mantsios, A., Abramovitz, DA., et al.** 2008. Individual, social, and environmental influences associated with HIV infection among injection drug users in Tijuana, Mexico. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 2008, 47:369–376.
443. **Streeck, H., Li, B., Poon, AF., Schneidewind, A., Gladden, AD., Power, K A., et al.** 2008. Immune-driven recombination and loss of control after HIV superinfection. *J Exp. Med* 205:1789-1796.
444. **Su, L., Graf, M., Zhang, Y., von Briesen, H., Xing, H., Kolster, J., et al** 2000. Characterization of a virtually full-length human immunodeficiency virus type 1 genome of a prevalent intersubtype (C/B') recombinant strain in China. *J Virol*. 74:11367-11376.
445. **Subbarao, S., Vanichseni, S., Hu, DJ., Kitayaporn, D., Choopanya, K., Raktham, S., et al.** 2000. Genetic characterization of incident HIV type 1 subtype E and B strains from a prospective cohort of injecting drug users in Bangkok, Thailand. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 16: 699-707.
446. **Sullivan, S., Mandava, U., Evans-Strickfaden, T., Lennox, JL., Ellerbrock, TV., and Hart, CE.** 2005. Diversity, divergence and evolution

- f cell-free human immunodeficiency virus type 1 in vaginal secretions and blood of chronically infected woman: associations with immune status. *J Virol*. 15:9799-9809.
447. **Sunpath, H., France, H., Tarin, M., Marconi, VC., Murphy, R., Kanegai, C., et al.** 2008. Prospective analysis of HIV-1 Drug Resistance After Virologic Failure on Antiretroviral Therapy (ART): Initial Results from a Paediatric Cohort Study from KZN, South Africa. 15th Conference on Retrovirus and Opportunistic Infections: Boston, MA 2008.
  448. **Suzuki, Y., and R. Craigie.** 2007. The road to chromatin - nuclear entry of retroviruses. *Nat Rev Microbiol* 5:187-196.
  449. **Suzuki, Y., and Y. Koyanagi.** 2007. [Modulation of HIV replication by cellular factors]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 52:1207-1213.
  450. **Swanson, P., S. Huang, K. Abravaya, C. de Mendoza, V. Soriano, S. G. Devare, and J. Hackett, Jr.** 2007. Evaluation of performance across the dynamic range of the Abbott RealTime HIV-1 assay as compared to VERSANT HIV-1 RNA 3.0 and AMPLICOR HIV-1 MONITOR v1.5 using serial dilutions of 39 group M and O viruses. *J Virol Methods* 141:49-57.
  451. **Sylla, M., Chamberland, A., Boileau, C., Traoré, H. A., Ag-Aaboubacrine, S., Cisse, M., et al.** 2008. Characterization of drug resistance in antiretroviral-treated patients infected with HIV-1 CRF02\_AG and AGK subtypes in Mali and Burkina Faso. *Antivir Ther* 13:141-148.
  452. **Takebe, Y., Motobura, K., Tsumi, M., Lwin, H. H., Zaw, M., and Kusagawa, S.** 2003. High prevalence of diverse forms of HIV-1 intersubtype recombinants in Central Myanmar: geographical hot spot of extensive recombination. *AIDS*. 17:2077-2087.
  453. **Takehisa, J., Kraus, M., Ayoub, A., Bailes, E., Van heuverswyn, F., Decker, J., et al.** 2009. Origin and biology of simian immunodeficiency virus in wild-living western gorillas. *Journal of Virology*. Vol 83, N° 4, 1635-1648.
  454. **Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., and Kumar, S.** 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*. 24, 1596-1599.
  455. **Tang, M. W., T. F. Liu, and R. W. Shafer.** 2012. The HIVdb system for HIV-1 genotypic resistance interpretation. *Intervirology* 55:98-101.
  456. **Tang, M. W., and R. W. Shafer.** 2012. HIV-1 antiretroviral resistance: scientific principles and clinical applications. *Drugs* 72:e1-25.
  457. **Taylor-Castillo, L., Leon-Bratti, M. P., Solano-Chinchilla, A., Herrera-Martinez, G., Boza-Cordero, R., Leon, B., et al.** 2010. Variability in HIV-1 partial genomic sequences in Costa Rican patients: analysis with different bioinformatics tools. *Rev Panam Salud Publica* 27:23-31.
  458. **Taylor, B., Sobieszczyk, M., McCutchan, F., and Hammer, S.** 2008. The challenge of HIV-1 subtype diversity. *N ENGL J MED*. 358:1590-1602.
  459. **Tee, K. K., X. J. Li, K. Nohtomi, K. P. Ng, A. Kamarulzaman, and Y. Takebe.** 2006. Identification of a novel circulating recombinant form (CRF33\_01B) disseminating widely among various risk populations in Kuala Lumpur, Malaysia. *J Acquir Immune Defic Syndr* 43:523-529.
  460. **Tee, K. K., O. G. Pybus, X. J. Li, X. Han, H. Shang, A. Kamarulzaman, and Y. Takebe.** 2008. Temporal and spatial dynamics of human

- immunodeficiency virus type 1 circulating recombinant forms 08\_BC and 07\_BC in Asia. *J Virol* 82:9206-9215.
461. **Tersmette, M., de Goede, R. E., Al, B. J., Winkel, I. N., Gruters, R. A., Cuypers, H. T., et al.** 1988. Differential syncytium-inducing capacity of human immunodeficiency virus isolates: frequent detection of syncytium-inducing isolates in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex. *J Virol* 62:2026-2032.
  462. **Tersmette, M., Gruters, R. A., de Wolf, F., de Goede, R., Lange, J. M., Schellekens, P. T. A., et al.** 1989. Evidence for a role of virulent human immunodeficiency (HIV) variants in the pathogenesis of acquired immunodeficiency syndrome: studies on sequential HIV isolates. *J Virol* 63:2118-2125.
  463. **Teva, I., M. P. Bermudez, M. T. Ramiro, and G. Buena-Casal.** 2012. [Current epidemiological situation of HIV/AIDS in Latin America: analysis of differences among countries]. *Rev Med Chil* 140:50-58.
  464. **Thomson, M.** 2001. Epidemiología molecular. Tipos, grupos y subtipos. Formas recombinantes circulantes. En: Salud pública y SIDA. Francisco Bueno Cañigral y Rafael Nájera Morrondo. Ediciones Doyma, S. L. Madrid. España.
  465. **Thomson, M., and Nájera, R.** 2001. Travel and the introduction of human immunodeficiency virus type 1 non-B subtype genetic forms into western countries. *Clin Infect Dis* 32:1732-1737.
  466. **Thomson, M., Delgado, E., Herrero, I., Villahermosa, M. L., Vázquez de Parga, E., Cuevas, M. T., et al.** 2002a. Diversity of mosaic structures and common ancestry of human immunodeficiency virus type 1 BF intersubtype recombinant viruses from Argentina revealed by analysis of near full-length genome sequences. *J Gen Virol* 83:107-119.
  467. **Thomson, M., Delgado, E., Manjón, N., Ocampo, A., Villahermosa, M. L., Mariño, A., et al. Spanish Group for Antiretroviral Studies in Galicia.** 2001. HIV-1 diversity in Galicia, Spain: BG intersubtype recombinant viruses circulating among injecting users. *AIDS* 15:509-516.
  468. **Thomson, M., Pérez-Álvarez, L., and Nájera, R.** 2002b. Molecular epidemiology of HIV-1 genetic forms and its significance for vaccine development and therapy. *Lancet Infect. Dis.* 2, 461-471.
  469. **Thomson, M., Sierra, M., Tanuri, A., May, S., Casado, G., Manjón, N., et al.** 2004. Analysis of near full-length genomes sequences of HIV type 1 BF intersubtype recombinant viruses from Brazil reveals their independent origins and their lack of relationship to CRF12\_BF. *AIDS Res Hum Retroviruses* 20:1126-1133.
  470. **Thomson, M., Villahermosa, M. L., Vázquez de Parga, E., Cuevas, M. T., Delgado, E., Manjón, N., et al.** 2000. Widespread circulation of a B/F intersubtype recombinant form among HIV-1 infected individuals in Buenos Aires, Argentina. *AIDS* 14:897-899.
  471. **Thomson, M. M., and R. Nájera.** 2005. Molecular epidemiology of HIV-1 variants in the global AIDS pandemic: an update. *AIDS Rev* 7:210-224. *AIDS Reviews*.
  472. **Thomson, M. M., G. Casado, D. Posada, M. Sierra, and R. Nájera.** 2005. Identification of a novel HIV-1 complex circulating recombinant form (CRF18\_cpx) of Central African origin in Cuba. *Aids* 19:1155-1163.



473. **Thomson, M. M., and A. Fernandez-Garcia.** 2011. Phylogenetic structure in African HIV-1 subtype C revealed by selective sequential pruning. *Virology* 415:30-38.
474. **Thomson, M. M., Vinogradova, A., Delgado, E., Rakhmanova, A., Yakovlev, A., Cuevas, M. T., et al.** 2009. Molecular epidemiology of HIV-1 in St Petersburg, Russia: predominance of subtype A, former Soviet Union variant, and identification of intrasubtype subclusters. *J Acquir Immune Defic Syndr* 51:332-339.
475. **Tovanabutra, S., Beyrer, C., Sakkhachornphop, S., Razak, MH., Ramos, GL., Vongchak, T., et al.** 2004. The changing molecular epidemiology of HIV type 1 among northern Thai drug users, 1999 to 2002. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 20:465-475.
476. **Tovanabutra, S., Watanaveeradej, V., Viputtikul, K., De Souza, M., Razak, MH., Suriyanon, V., et al.** 2003. A new circulating recombinant form, CRF15\_01B, reinforces the linkage between IDU and heterosexual epidemics in Thailand. *AIDS Res Hum. Retroviruses* 19:561-567.
477. **Troyer, R. M., Collins, KR., Abraham, A., Fraundorf, E., Moore, DM., Krizan, RW., et al.** 2005. Changes in human immunodeficiency virus type 1 fitness and genetic diversity during disease progression. *J Virol* 79:9006-9018.
478. **Tscherning, C., Alaeus, A., Fredriksson, R., Bjorndal, A., Deng, H., Littman, D. R., et al.** 1998. Differences in chemokine coreceptor usage between genetic subtypes of HIV-1. *Virology* 241:181-188.
479. **Turner, D., Brenner, B., Moisi, D., Detorio, M., Cesaire, R., Kurimura, T., et al.** 2004. Nucleotide and amino acid polymorphisms at drug resistance sites in non-B-subtype variants of human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob Agents Chemother* 48:2993-2998.
480. **Turner, D., Shahar, E., Katchman, E., Kedem, E., Matus, N., Katzir, M., et al.** 2009. Prevalence of the K65R resistance reverse transcriptase mutation in different HIV-1 subtypes in Israel. *J Med Virol* 81:1509-1512.
481. **Uhl, E. W., Martin, J. K. Coleman, and J. K. Yamamoto.** 2008. Advances in FIV vaccine technology. *Vet Immunol Immunopathol* 123:65-80.
482. **Usami, Y., Popov, S., Popova, E., Inoue, M., Weissenhorn, W., and G. Gottlinger H.** 2009. The ESCRT pathway and HIV-1 budding. *Biochem Soc Trans* 37:181-184.
483. **Valer, L., de Mendoza, C., and Soriano, V.** 2003. Superinfección por el virus de la inmunodeficiencia humana: implicaciones clínicas y biológicas. *Med Clin (Barc)*, 121 (5):192-196.
484. **Vallari, A., Bodelle, P., Ngansop, C., Makamche, F., Ndembu, N., Mbanya, D., et al.** 2010. Four new HIV-1 group N isolates from Cameroon: Prevalence continues to be low. *AIDS Res Hum. Retroviruses* 26:109-115.
485. **Vallari, A., Holzmayer, V., Harris, B., Yamaguchi, J., Ngansop, C., Makamche, F., et al.** 2011. Confirmation of putative HIV-1 group P in Cameroon. *J Virol* 85:1403-1407.
486. **Van Damme, N., Goff, D., Katsura, C., Jorgenson, R. L., Mitchell, R., Johnson, M. C., et al.** 2008. The interferon-induced protein BST-2 restricts HIV-1 release and is downregulated from the cell surface by the viral Vpu protein. *Cell Host Microbe* 3:245-252.

487. **van de Vijver, D. A., Wensing, A. M., Angarano, G., Asjo, B., Balotta, C., Boeri, E., et al.** 2006. The calculated genetic barrier for antiretroviral drug resistance substitutions is largely similar for different HIV-1 subtypes. *J Acquir Immune Defic Syndr* 41:352-360.
488. **van der Kuyl, A. C., and M. Cornelissen.** 2007. Identifying HIV-1 dual infections. *Retrovirology* 4:67.
489. **van Gils, M. J., D. Edo-Matas, B. Sch weighardt, T. Wrin, a nd H. Schuitemaker.** 2010. High prevalence of neutralizing activity against multiple unrelated human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) subtype B variants in sera from HIV-1 subtype B-infected individuals: evidence for subtype-specific rather than strain-specific neutralizing activity. *J Gen Virol* 91:250-258.
490. **van Harmelen, J., R. Wood, M. Lambrick, E. P. Ry bicki, A. L. Williamson, and C. Williamso n.** 1997. An association between HIV-1 subtypes and mode of transmission in Cape Town, South Africa. *Aids* 11:81-87.
491. **van Opijn en, T., R. E. Jeeninga, M. C. Boerlijst, G. P. Pollakis, V. Zetterberg, M. Sa lminen, and B. Berkhout.** 2004. Human immunodeficiency virus type 1 subtypes have a distinct long terminal repeat that determines the replication rate in a host-cell-specific manner. *J Virol* 78:3675-3683.
492. **van Regenmortel, M. H. V., Fa uquet, C.M., Bishop, D.H.L., C arstens, E.B., Estes, M.K., Le mon, S.M., et al.** 2000. *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Academic Press. United States of America.
493. **Van't Wout, A., Koostra, NA., Mu lder-Kampinga, GA., Albrecht-van-Lent, N., Scherpbier, HJ., Veenstra, J., et al.** 1994. Macrophage-tropic variants initiate human immunodeficiency virus type 1 infection after sexual, parenteral and vertical transmission. *J Clin Investig.* 94:2060-2067.
494. **Vandegraaff, N., and A. Engelman.** 2007. Molecular mechanisms of HIV integration and therapeutic intervention. *Expert Rev Mol Med* 9:1-19.
495. **Vasan, A., Renjifo, B., Hertzmar k, E., Chaplin, B., Msamanga, G., Essex, M., et al.** 2006. Different rates of disease progression of HIV type 1 infection in Tanzania based on infecting subtype. *Clin Infect Dis* 42:843-852.
496. **Vaughan, H. E., P. Cane, D. Pillay, and R. S. Tedder.** 2003. Characterization of HIV type 1 clades in the Caribbean using pol gene sequences. *AIDS Res Hum Retroviruses* 19:929-932.
497. **Vazquez-Valls, E., Escoto-Delgad illo, M., Lopez-Marquez, F. C., Castellero-Manzano, M., Echegaray-Guerrero, E., Bitzer-Quin tero, O. K., et al.** 2010. Molecular epidemiology of HIV type 1 in Mexico: emergence of BG and BF intersubtype recombinants. *AIDS Res Hum Retroviruses* 26:777-781.
498. **Vazquez de Parga, E., Rakhma nova, A., Perez-Alvarez, L., Vinogradova, A., Delgado, E., Thomson, M. M., et al.** 2005. Analysis of drug resistance-associated mutations in treatment-naive individuals infected with different genetic forms of HIV-1 circulating in countries of the former Soviet Union. *J Med Virol* 77:337-344.

499. **Veras, N. M., R. R. Gray, L. F. Brígido, R. Rodrigues, and M. Salemi.** 2011. High-resolution phylogenetics and phylogeography of human immunodeficiency virus type 1 subtype C epidemic in South America. *J Gen Virol* 92:1698-1709.
500. **Vergne, L., Bourgeois, A., Mpoudi-Ngole, E., Mounoudou, R., Mbuagbaw, J., Liegeois, F., et al.** 2003. Biological and genetic characteristics of HIV infections in Cameroon reveals dual group M and O infections and a correlation between SI-inducing phenotype of the predominant CRF02\_AG variant and disease stage. *Virology* 310:254-266.
501. **Vidal, N., Peeters, M., Mulanga-Kabeya, C., Nzilambi, N., Robertson, D., Ilunga, W., et al.** 2000. Unprecedented degree of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) group M genetic diversity in the Democratic Republic of Congo suggests that the HIV-1 pandemic originated in Central Africa. *J Virol.* 74:10498-10507.
502. **Villahermosa, M., Thomson, M., Vázquez de Parga, E., Cuevas, MT., Contreras, G., Pérez-Álvarez, L., et al.** 2000. Improved conditions for extraction and amplification of human immunodeficiency virus type 1 RNA from plasma samples with low viral load. *J Hum Virol.* 3, 27-34.
503. **Villarreal, J. L., J. Gutierrez, L. Palacio, M. Penuela, R. Hernandez, G. Lemay, and G. Cervantes-Acosta.** 2012. Characterization of HIV Type 1 Envelope Sequence Among Viral Isolates Circulating in the Northern Region of Colombia, South America. *AIDS Res Hum Retroviruses*:1779-1783.
504. **Viñoles, J., Serra, M., Russi, J. C., Ruchansky, D., Sosa-Estani, S., Montano, S. M., et al.** 2005. Seroincidence and phylogeny of human immunodeficiency virus infections in a cohort of commercial sex workers in Montevideo, Uruguay. *Am J Trop Med Hyg* 72:495-500.
505. **Wallis C, B. C., Boulme R, Sanne I, Venter F, Papathanasopoulos M, and Stevens W.** 2007. Emerging ART Drug Resistance in Subtype C: Experience from the 2 Clinics in Johannesburg, South Africa. 14th Conference of Retroviruses and Opportunistic Infections: Los Angeles, CA 2007.
506. **Wallis, C. L., J. W. Mellors, W. D. Venter, I. Sanne, and W. Stevens.** 2009. Varied patterns of HIV-1 drug resistance on failing first-line antiretroviral therapy in South Africa. *J Acquir Immune Defic Syndr* 53:480-484.
507. **Wang, C., Y. Mitsuya, B. Gharizadeh, M. Ronaghi, and R. W. Shafer.** 2007. Characterization of mutation spectra with ultra-deep pyrosequencing: application to HIV-1 drug resistance. *Genome Res* 17:1195-1201.
508. **Weber, B., E. H. Fall, A. Berger, and H. W. Doerr.** 1998. Reduction of diagnostic window by new fourth-generation human immunodeficiency virus screening assays. *J Clin Microbiol* 36:2235-2239.
509. **Wei, X., S.K., Ghosh, M. E., Taylor, V. A., Johnson, E. A., Emini, P., Deutsch, et al.** 1995. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* 373:117-122.
510. **Whelan, S., Lio, P., and Goldman, N.** 2001. Molecular phylogenetics: state-of-the-art methods for looking into the past. *TRENDS in Genetics.* Vol 17 N° 5, 262-272.

511. **Wilkinson, M.** 1996. Majority-rule reduced consensus trees and their use in bootstrapping. *Mol Biol Evol* 13:437-444.
512. **Wittkop, L., Gunthard, H. F., de Wolf, F., Dunn, D., Cozzi-Lepri, A., de Luca, A., et al.** 2011. Effect of transmitted drug resistance on virological and immunological response to initial combination antiretroviral therapy for HIV (EuroCoord-CHAIN joint project): a European multicohort study. *Lancet Infect Dis* 11:363-371.
513. **Wood, N., Bhattacharya, T., Keele, BF., Giorgi, E., Liu, M., Gao, B., et al.** 2009. HIV evolution in early infection: selection pressures, patterns of insertion and deletion, and the impact of APOBEC. *PLoS Pathog.* 5:e1000414.
514. **Worobey, M., Gemmel, M., Teuwen, DE., Haselkorn, T., Kunstman, K., Bunce, M., et al.** 2008. Direct evidence of extensive diversity of HIV-1 in Kinshasa by 1960. *Nature* 455:661-664.
515. **Wrobel, B., M. Torres-Puente, N. Jimenez, M. A. Bracho, I. Garcia-Robles, A. Moaya, and F. Gonzalez-Candelas.** 2006. Analysis of the overdispersed clock in the short-term evolution of hepatitis C virus: Using the E1/E2 gene sequences to infer infection dates in a single source outbreak. *Mol Biol Evol* 23:1242-1253.
516. **Yabar, C. A., M. Acuna, C. Gazzo, G. Salinas, F. Cardenas, A. Valverde, and S. Romero.** 2012. New Subtypes and Genetic Recombination in HIV Type 1-Infecting Patients with Highly Active Antiretroviral Therapy in Peru (2008-2010). *AIDS Res Hum Retroviruses*:1712-1722.
517. **Yamaguchi, J., Bodelle, P., Vallari, AS., Coffey, R., McArthur, CP., Schochetman, G., et al.** 2004. HIV infections in northwestern Cameroon: identification of HIV type 1 group O and dual HIV type 1 group M and group O infections. *AIDS Res Hum. Retroviruses* 20:944-957.
518. **Yang, H., Wang, J., Jia, X., McNatt, M. W., Zang, T., Pan, B., et al.** 2010. Structural insight into the mechanisms of enveloped virus tethering by tetherin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:18428-18432.
519. **Yang, R., Xia, R., Kusagawa, S., Zhang, C., Ben, K., and Takebe, Y.** 2002. On-going generation of multiple forms of HIV-1 intersubtype recombinants in the Yunnan province of China. *AIDS*. 16:1401-1407.
520. **Yaotse, D. A., V. Nicole, N. F. Roch, P. D. Mireille, D. Eric, and P. Martine.** 2009. Genetic characterization of HIV-1 strains in Togo reveals a high genetic complexity and genotypic drug-resistance mutations in ARV naive patients. *Infect Genet Evol* 9:646-652.
521. **Zaitseva, M., Blauvelt, A., Lee, S., Lapham, CK., Kalus-Kovton, V., Mostowski, M., et al.** 1997. Expression and function of CCR5 and CXCR4 on human Langerhans cells and macrophages: implications for HIV primary infection. *Nature Med.* 3:1369-1375.
522. **Zanetti, G., J. A. Briggs, K. Grunewald, Q. J. Santantau, and S. D. Fuller.** 2006. Cryo-electron tomographic structure of an immunodeficiency virus envelope complex in situ. *PLoS Pathog* 2:e83.
523. **Zhang, J., S. Y. Rhee, J. Taylor, and R. W. Shafer.** 2005. Comparison of the precision and sensitivity of the Antivirogram and PhenoSense HIV drug susceptibility assays. *J Acquir Immune Defic Syndr* 38:439-444.

524. **Zhang, L., Y. Huang, T. He, Y. Cao, and D. D. Ho.** 1996. HIV-1 subtype and second-receptor use. *Nature* 383:768.
525. **Zhu, P., Liu, J., Bess, J., Jr., Chertova, E., Lifson, J. D., Grise, H., et** 2006. Distribution and three-dimensional structure of AIDS virus envelope spikes. *Nature* 441:847-852.
526. **Zhu, T., Korber, B.T., Nahmias, A.J., Hooper, E., Shapiro, P.M., and Ho, D.D.** 1998. An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic. *Nature*. 5;391(6667):594-597.
527. **Zhu, T., Wang, N., Carr, A., Nam, D.S., Moor-Jankowski, R., Cooper, D.A., and Ho, D.D.** 1996. Genetic characterization of human immunodeficiency virus type 1 in blood and genital secretions: evidence for viral compartmentalization and selection during sexual transmission. *J Virol*. 5:3098-3107.
528. **Zhuang, J., Jetzt, A.E., Sun, G., Yu, H., Klarmann, G., Ron, Y., et al.** 2002. Human immunodeficiency virus type 1 recombination: rate, fidelity, and putative hot spots. *J Virol*. 76(22):11273-11282.

# **APÉNDICE**

**Tabla A1 del Apéndice.** Datos clínicos y epidemiológicos de los individuos infectados por VIH-1 residentes en Panamá, incluyendo tanto asintomáticos como con SIDA, en los que se pudo secuenciar algún fragmento del genoma viral.

Paciente	Sexo <sup>a</sup>	Edad	Lugar de residencia <sup>b</sup>	Factor de riesgo <sup>c</sup>	Año de diagnóstico de infección por VIH-1	Año de diagnóstico de SIDA	Carga viral <sup>d</sup>	CD4 <sup>+</sup> <sup>e</sup>	CD8 <sup>+</sup> <sup>f</sup>	Manifestaciones Clínicas
PA_1	V	42	Chiriquí	Het	-	2004	179.000	102	710	Toxoplasmosis del SNC
PA_2	V	61	San Miguelito	Het	1996	2003	14.900	73	368	Toxoplasmosis del SNC
PA_3	V	39	Chiriquí	Ho	-	2003	98.400	44	575	Histoplasmosis y toxoplasmosis
PA_4	M	27	San Miguelito	Het	-	2004	272.000	66	870	Toxoplasmosis cerebral
PA_6	M	39	San Miguelito	Het	2003	2004	454.000	273	943	Histoplasmosis
PA_7	V	34	Arraiján	Het	-	2004	835.000	22	665	TB
PA_8	V	34	Arraiján	Het	-	2004	302.000	76	975	TB pulmonar e histoplasmosis
PA_9	V	31	Panamá	Bi	-	2004	175.000	27	401	TB ganglionar
PA_10	V	45	Panamá	Het	1994	2004	11.400	97	1206	TB pulmonar
PA_12	V	47	Colón	Het	-	2003	430.000	203	831	TB pulmonar
PA_13	V	35	Panamá	Het	-	2004	686.000	9	875	Histoplasmosis
PA_14	V	33	Arraiján	Het	-	2003	547.000	24	789	Histoplasmosis
PA_15	V	44	Bocas del Toro	Het	-	2004	682.000	36	304	Toxoplasmosis del SNC

Diversidad genética del VIH-1 en Panamá

PA_17	V	25	Capira	Ho	-	2004	100.000	96	794	PCP
PA_18	V	36	Arraiján	Het	-	2004	750.000	2	734	Histoplasmosis y toxoplasmosis
PA_20	V	33	San Miguelito	Ho	-	2004	314.000	49	837	Toxoplasmosis y herpes simplex
PA_21	V	48	Panamá	Het	-	2004	250.000	169	798	TB
PA_23	V	49	Panamá	Ho	2000	2003	750.000	203	626	Neumonía bacteriana por neumococo
PA_24	V	33	Arraiján	Het	1995	2003	503.000	185	1771	Histoplasmosis
PA_25	M	48	La Chorrera	Het	-	2004	>750.000	20	67	TB e histoplasmosis
PA_26	M	54	San Miguelito	Het	1995	2004	8,230.000	161	653	Absceso inguinal
PA_28	V	29	Panamá	Het	-	2004	750.000	49	567	TB e histoplasmosis
PA_29	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PA_30	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PA_31	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PA_33	V	42	Panamá	Het	-	2004	1,000.000	12	580	Sarcoma de Kaposi
PA_34	V	36	San Miguelito	Ho	-	2004	232.000	9	160	TB
PA_35	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PA_36	V	32	Panamá	Bi	1998	2003	133.000	196	1160	TB y PCP
PA_38	V	30	San Miguelito	Ho	-	2004	1,290.000	71	870	Toxoplasmosis del SNC
PA_39	V	38	Panamá	Het	1989	2004	215.000	122	1644	TB pulmonar
PA_40	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-



Diversidad genética del VIH-1 en Panamá

PA_41	V	35	San Miguelito	Ho	1992	2004	166.000	40	1100	TB ganglionar
PA_42	M	28	San Miguelito	Het	2003	2005	358.000	99	510	Histoplasmosis
PA_43	M	58	Chepo	Het	-	2002	300.000	144	392	Toxoplasmosis
PA_44	V	27	Panamá	Ho	-	2003	320.000	107	650	Histoplasmosis
PA_45	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PA_46	V	38	Panamá	Het	-	-	-	-	-	-
PA_47	V	37	Panamá	Het	1992	2001	12.500	190	973	Histoplasmosis
PA_48	V	39	San Miguelito	Ho	1994	2004	>1,000.000	150	892	-
PA_49	V	30	San Miguelito	Het	-	2004	54.000	21	527	Histoplasmosis
PA_51	V	34	San Miguelito	Ho	-	2004	117.000	25	590	Histoplasmosis
PA_52	V	30	San Miguelito	Het	-	-	-	-	-	-
PA_50	V	58	Panamá	Het	-	2005	750.000	225	699	-
PA_05_51	V	41	Panamá	Ho	2000	2005	473.000	89	303	Molusco contagioso y TB meníngea
PA_05_52	V	50	Panamá	Het	-	2000	140.000	24	292	Candidiasis esofágica y PCP
PA_53	V	63	Panamá	Het	-	2005	432.000	66	507	PCP
PA_54	V	74	Panamá	Ho	-	2005	-	-	-	Candidiasis oral, sífilis y toxoplasmosis del SNC
PA_55	V	52	Panamá	Het	2004	2005	1,460.000	30	633	-
PA_57	V	46	Panamá	Het	-	2005	255.000	60	832	Diarrea aguda
PA_58	V	54	Arraiján	Het	-	2002	924.000	65	330	Histoplasmosis

Diversidad genética del VIH-1 en Panamá

PA_59	V	42	Panamá	Het	2003	2005	-	31	82	TB Pulmonar
PA_60	V	56	Panamá	Het	-	2005	3,400.000	40	218	-
PA_61	V	46	Colón	Bi	-	2005	-	31	1135	-
PA_62	V	74	Panamá	Ho	-	-	-	-	-	Sífilis y toxoplasmosis del SNC
PA_63	V	34	La Chorrera	Het	-	2005	138.000	59	638	Histoplasmosis
PA_65	V	39	Arraiján	Ho	-	2005	652.000	15	446	Otitis media
PA_66	V	55	Panamá	Het	-	2002	250	124	750	Histoplasmosis
PA_67	V	45	Arraiján	Het	-	2005	-	-	-	-
PA_68	V	68	San Miguelito	Het	-	2005	781.000	42	771	Histoplasmosis
PA_69	V	38	Panamá	Het	-	2005	-	-	-	Histoplasmosis y neumonía bacteriana
PA_70	V	28	San Miguelito	Het	-	2005	1,460.000	161	251	PCP
PA_71	V	50	Arraiján	Het	2000	-	-	378	1020	Neumonía por neumococo
PA_72	M	34	San Miguelito	Het	2002	2005	1,000.000	40	372	Histoplasmosis y TB
PA_73	V	29	Panamá	Het	-	2005	-	-	-	Histoplasmosis
PA_74	V	27	Panamá	Het	-	2005	2,030.000	19	309	Histoplasmosis
PA_75	V	36	San Miguelito	Het	-	2005	1,200.000	28	475	Fiebre de etiología desconocida e histoplasmosis
PA_76	M	27	Panamá	Het	-	2005	1,000.000	172	657	Herpes genital e histoplasmosis
PA_78	V	33	Panamá	Ho	-	2005	927.000	53	570	Toxoplasmosis del SNC
PA_79	V	38	San Miguelito	Ho	-	2005	671.000	42	906	TB

Diversidad genética del VIH-1 en Panamá

PA_80	V	31	San Miguelito	Het	-	2005	619.000	39	947	Toxoplasmosis
PA_81	V	26	-	-	-	2005	253.000	574	564	-
PA_82	V	42	Panamá	Het	-	2005	-	-	-	Toxoplasmosis del SNC
PA_83	V	34	Panamá	Ho	-	2005	1,890.000	305	1075	Absceso cerebral causado por enterococo
PA_84	V	52	Panamá	Het	-	2005	96.100	103	1688	TB Pulmonar
PA_85	V	32	Panamá	Ho	-	2005	4,070.000	59	192	Histoplasmosis
PA_86	V	42	Panamá	Het	-	2005	600.000	135	376	-
PA_87	V	25	Panamá	Ho	-	2005	5,060.000	163	679	-
PA_101	M	48	San Miguelito	Het	2005	-	106.000	213	744	-
PA_102	V	31	Panamá	Het	-	-	-	-	-	-
PA_103	V	25	Panamá	Het	2005	-	5,060,000	163	679	-
PA_104	V	36	Arraiján	Het	2005	-	284.000	483	679	-
PA_105	V	43	San Miguelito	Het	2001	-	48.200	225	1139	Encefalitis por Toxoplasma
PA_106	V	53	Arraiján	Het	1997	2005	146.000	261	1226	-
PA_107	M	30	San Miguelito	Het	2001	2005	36.900	420	679	-
PA_108	M	30	Panamá	Het	-	-	-	-	-	-
PA_109	V	21	La Chorrera	Het	-	-	-	-	-	-
PA_110	V	35	Arraiján	Het	2002	2005	12.000	474	3146	-
PA_111	M	24	Arraiján	Het	2005	-	10.900	203	782	-

Diversidad genética del VIH-1 en Panamá

PA_112	V	39	Arraiján	Het	2005	-	361.000	145	2516	Herpes zoster
PA_113	V	37	Panamá	Het	-	-	-	-	-	-
PA_114	M	26	Panamá	Het	2005	-	253.000	34	1218	Candidiasis esofágica y gastroenteritis
PA_115	V	41	Panamá	-	-	-	-	-	-	-
PA_116	V	-	Arraiján	-	-	-	-	-	-	-
PA_117	V	22	Panamá	Het	-	-	-	-	-	-
PA_118	M	29	Arraiján	-	-	-	-	-	-	-
PA_119	V	20	Panamá	Ho	-	-	-	-	-	-
PA_120	V	32	Panamá	Het	2005	-	418.000	222	1282	-
PA_121	V	33	Panamá	Het	2005	-	917.000	10	297	-
PA_122	V	25	Panamá	Ho	2005	-	166.000	111	482	-
PA_123	V	36	La Chorrera	Het	-	-	-	-	-	-
PA_124	M	41	San Miguelito	Het	2005	-	30.800	108	862	-
PA_125	M	27	Panamá	Het	2003	-	160.000	284	1254	-
PA_126	M	32	San Miguelito	Het	2005	-	657.000	152	1111	-
PA_127	V	38	Panamá	-	-	-	-	-	-	-
PA_128	M	41	Colón	Het	-	-	-	-	-	-
PA_129	V	43	Panamá	-	-	-	-	-	-	-
PA_130	V	48	Panamá	-	-	-	-	-	-	-

Diversidad genética del VIH-1 en Panamá

PA_131	V	-	Arraiján	-	-	-	-	-	-	-
PA_132	V	-	Arraiján	-	-	-	-	-	-	-
PA_133	M	26	Colón	Het	-	-	-	-	-	-
PA_134	V	34	La Chorrera	-	-	-	-	-	-	-
PA_136	V	47	Arraiján	Het	2003	-	147.000	270	852	-
PA_137	M	-	Panamá	Het	2005	-	56.600	170	804	-
PA_138	M	19	Panamá	Het	-	-	-	-	-	-
PA_139	M	29	San Miguelito	Het	2005	-	31.900	44	445	Sinusitis aguda
PA_140	V	24	Panamá	-	-	-	-	-	-	-
PA_141	V	20	Coclé	Het	2005	-	144.000	298	834	-
PA_142	M	35	Panamá	Het	-	-	-	-	-	-
PA_143	V	28	San Miguelito	-	2005	-	1.600	211	440	-
PA_144	V	39	Panamá	-	2005	-	44.000	139	742	-
PA_145	V	55	Panamá	-	-	-	-	-	-	-
PA_146	V	49	San Miguelito	-	2005	-	1,230.000	117	1003	TB pulmonar
PA_147	V	32	Veraguas	-	2004	-	2.110	223	1116	-
PA_148	V	41	Panamá	-	-	-	-	-	-	-
PA_149	V	27	San Miguelito	-	-	-	-	-	-	-
PA_150	V	64	Panamá	Ho	-	2005	790.000	160	433	-

Diversidad genética del VIH-1 en Panamá

PA_151	V	41	Arraiján	-	-	2003	119.000	328	1116	-
PA_152	V	25	San Miguelito	-	-	-	-	-	-	-
PA_153	V	34	Panamá	-	-	-	-	-	-	-
PA_154	V	38	Panamá	-	2005	-	74.200	254	2036	-
PA_155	M	24	Panamá	Het	-	-	-	-	-	-
PA_201	V	-	-	Bi	-	-	-	-	-	TB, candidiasis oral y gonorrea
PA_202	V	41	Colón	Het	-	-	-	-	-	Gastroenteritis crónica bacteriana
PA_203	V	47	Colón	-	-	-	-	-	-	Toxoplasmosis del SNC
PA_204	V	34	San Miguelito	-	-	-	-	52	797	Candidiasis oral, histoplasmosis y toxoplasmosis del SNC
PA_205	V	41	Capira	-	-	-	-	-	-	Gastroenteritis, cirrosis, síndrome de consunción y TB pulmonar
PA_206	V	36	San Miguelito	Het	-	-	-	-	-	Osteomielitis del 1 <sup>er</sup> metacarpiano
PA_207	M	29	Arraiján	-	2003	2005	-	-	-	Síndrome de consunción, toxoplasmosis del SNC y candidiasis oral
PA_208	V	53	Panamá	-	2004	2005	-	-	-	Parálisis cerebral
PA_209	M	23	Panamá	-	2004	2005	-	-	-	Celulitis
PA_210	V	31	Panamá	-	-	-	-	-	-	-
PA_211	V	42	Panamá	-	2005	2005	-	-	-	TB y PCP
PA_212	V	32	Guna Yala	-	-	-	-	-	-	Diarrea crónica, amebiasis y colitis bacteriana.

PA_214	V	35	Colón	-	2005	-	-	-	-	-
PA_216	V	26	Arraiján	-	2005	-	-	-	-	-
PA_217	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup>V: varón, M: mujer.

<sup>b</sup>Panamá: muestras recolectadas en el Distrito de Panamá.

<sup>c</sup>Het: contacto heterosexual, Ho: contacto homosexual, Bi: contacto bisexual.

<sup>d</sup>Carga viral: copias de ARN por ml de plasma.

<sup>e</sup>Número de células CD4<sup>+</sup> por microlitro de sangre.

<sup>f</sup>Número de células CD8<sup>+</sup> por microlitro de sangre.

TB: Tuberculosis; SNC: sistema nervioso central; PCP: Neumonía por *Pneumocystis jirovecii*.

- : No determinado o no conocido.

# **ARTÍCULOS**



## Sequence Note

# High Divergence within the Major HIV Type 1 Subtype B Epidemic in Panama

Sara Ahumada-Ruiz,<sup>1,2</sup> Concepción Casado,<sup>1</sup> Iván Toala-González,<sup>3</sup> Dario Flores-Figueroa,<sup>3</sup> Amalia Rodríguez-French,<sup>4</sup> and Cecilio López-Galíndez<sup>1</sup>

### Abstract

The first molecular epidemiology study of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in Panama has been performed with plasma samples from 66 AIDS patients infected by different transmission routes and obtained from distinct locations. All samples were amplified by RT-PCR and sequenced in *gag* (p17) and *env* (C2–C4) genes. Phylogenetic analyses revealed that 64 (97%) of the samples belong to subtype B. We also identified the presence of two CRF, one CRF12\_BF and one CRF02\_AG. The most notable feature of the subtype B epidemic in Panama was the large genetic distance among isolates with a mean of 15.2% but reaching up to 31.3 % in *env*, indicating an epidemic with a long period of evolution.

THE HIGH DEGREE OF GENETIC VARIABILITY OF HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE-1 (HIV-1) in nature is well documented.<sup>1–3</sup> Phylogenetic analysis of HIV-1 sequences permitted the definition of at least nine subtypes within the major M group (A–K) and 34 circulating recombinant forms (CRFs).<sup>1–4</sup> On the American continent, the presence of subtype B has been documented in the United States, Brazil, Argentina, Paraguay, Uruguay, Chile, Venezuela, and recently Honduras.<sup>2,5–7</sup> In contrast, knowledge about the molecular epidemiology of HIV-1 in Central American countries, including Panama, is very limited or nonexistent.

To our knowledge, there are no published studies describing the subtype distribution of HIV-1 in Panama; in addition, no HIV-1 sequences from Panama have been deposited in GenBank. The aim of the present study was to determine the HIV-1 subtype distribution and to characterize the viral genetic diversity in different risk groups and regions in Panama.

Panama with a total population of 3,228,186 million had 8486 reported AIDS cases to 2007.<sup>8</sup> The first AIDS case was reported in September 1984.<sup>9</sup> Up to 2006, 5417 (72.4%) cumulative deaths due to AIDS (AIDS mortality cases) have

been reported. The number of people aged 15–49 years living with HIV/AIDS has been estimated to be between 15,000 and 18,000 up to 2005, with a national prevalence of HIV/AIDS of 0.92%.<sup>9–11</sup> The male-to-female ratio among HIV-1-infected people was estimated as 3:1.<sup>9,11</sup> The HIV/AIDS epidemic is concentrated primarily in urban areas (Panama District, Colon Province, San Miguelito District, and West Panama).<sup>9</sup>

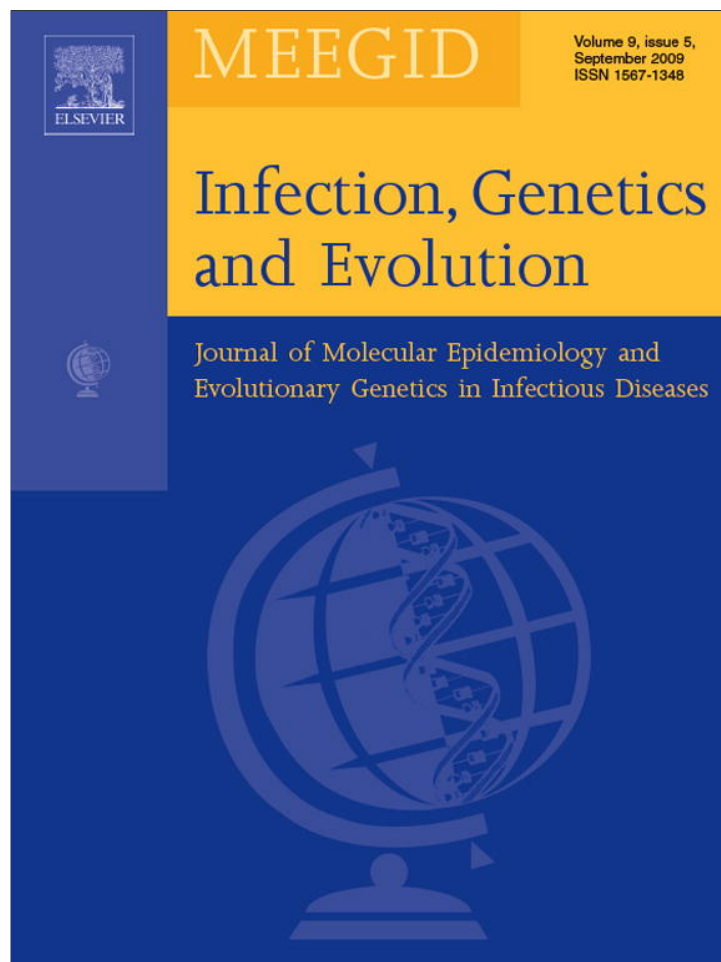
After obtaining signed informed consent, blood samples were collected from 66 AIDS Panamanian patients, from Complejo Hospitalario Dr. Arnulfo Arias Madrid, Caja del Seguro Social de Panama (CSS), and Hospital Santo Tomas (HST). All samples were collected in 2004 and 2005, corresponding to 6 women and 60 men. Risk exposures were 36 heterosexual (54.5%), 11 homosexual (17%), 4 bisexual (6.1%), and 15 unknown. The ages ranged from 23 to 74 years. Places of residence were 32 Panama District, 11 San Miguelito District, 9 West Panama, 4 Colon Province, 1 each East Panama, Bocas del Toro Province, Chiriqui Province, and Comarca Kuna Yala, and 6 of unknown origin. The epidemiological and clinical data are summarized in Table 1.

<sup>1</sup>Servicio de Virología Molecular, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain.

<sup>2</sup>Laboratorio de Microbiología Experimental y Aplicada, Vicerrectoria de Investigación y Posgrado, Universidad de Panamá, Panama City, Panama.

<sup>3</sup>Sala de Infectología, Complejo Hospitalario Dr. Arnulfo Arias Madrid, Caja del Seguro Social de Panamá, Panama City, Panama.

<sup>4</sup>Sala de Infectología, Hospital Santo Tomás, Panama City, Panama.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

## Infection, Genetics and Evolution

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/meegid](http://www.elsevier.com/locate/meegid)

# Analysis of HIV-1 *pol* sequences from Panama: Identification of phylogenetic clusters within subtype B and detection of antiretroviral drug resistance mutations<sup>☆</sup>

Sara Ahumada-Ruiz<sup>a,b</sup>, Dario Flores-Figueroa<sup>c</sup>, Iván Toala-González<sup>c</sup>, Michael M. Thomson<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Ctra. Majadahonda-Pozuelo, Km. 2, 28220 Majadahonda, Madrid, Spain

<sup>b</sup> Laboratorio de Microbiología Experimental y Aplicada, Universidad de Panamá, Panamá

<sup>c</sup> Departamento de Enfermedades Infecciosas, Caja del Seguro Social de Panamá, Panamá

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 13 February 2009

Received in revised form 13 June 2009

Accepted 15 June 2009

Available online 24 June 2009

## Keywords:

HIV-1

Panama

Subtype B

Phylogeny

Antiretroviral drug resistance

## ABSTRACT

We report the first study to examine phylogenetic relationships and drug resistance mutations in HIV-1 *pol* sequences from Panama. For this study, we used plasma RNA samples from 135 HIV-1-infected subjects from Panama, of which 82 (61%) had AIDS and 53 (39%) were asymptomatic drug-naïve individuals. Phylogenetic analyses revealed that 133 (98%) subjects were infected with subtype B viruses and 2 AIDS patients harboured recombinant viruses, CRF02\_AG/A3 and CRF12\_BF/B, respectively. Using a Bayesian phylogeny inference method, 5 strongly supported clusters of  $\geq 5$  sequences, designated B-PA1 to B-PA5, were identified within subtype B, together comprising 87 (65.4%) subtype B viruses. Cluster B-PA1 ( $n = 42$ ) was significantly associated with East Panama and clusters B-PA2 ( $n = 15$ ) and B-PA4 ( $n = 10$ ) were associated with West Panama. A Bayesian coalescent analysis indicated that the most recent common ancestors of the four largest clusters were dated in the 1980s and that of the fifth in the early 1990s. The analysis of antiretroviral drug resistance-associated mutations revealed that 8 (9.7%) AIDS patients, all of them antiretroviral drug-experienced, harboured mutations conferring high or intermediate resistance levels to antiretroviral drugs. No drug resistance mutations were detected among the asymptomatic drug-naïve individuals. In conclusion, the phylogenetic analysis of HIV-1 *pol* sequences from Panama reveals that a majority of subtype B viruses, which are predominant in Panama, branch within well supported intrasubtype phylogenetic clusters, most of them originating in the 1980s, and some with geographical associations, which may reflect either multiple HIV-1 subtype B introductions or the existence of local transmission networks originating in the early epidemic in Panama.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

The high genetic diversity of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) derives from a highly error-prone viral reverse transcriptase (RT), frequent recombination events during reverse transcription, short replication times and large population sizes (Nájera et al., 2002; Kijak and McCutchan, 2005). By means of these mechanisms, HIV-1 has diversified extensively into numerous genetic forms, which include three groups, of which group M, the causative of the pandemic, is subdivided in 9 subtypes (A–K), 6 sub-subtypes, 43 circulating recombinant forms (CRFs) and

multiple unique recombinant forms (URFs) (Thomson et al., 2002a; Nájera et al., 2002; Kijak and McCutchan, 2005; Los Alamos HIV Sequence Database, 2009).

HIV-1 genetic variability is an important factor to be considered in the management of antiretroviral (ARV) drug-treated patients, since it may determine the selection of viral populations with decreased susceptibility to currently used drugs (Teixeira et al., 2006; Ríos et al., 2007). The surveillance of ARV resistance mutations is necessary, mainly in resource-limited countries where ARV treatment is being introduced, because the transmission and dissemination of drug-resistant strains may have major public health implications, in order to provide guidelines for the choice of ARV drug regimens and to design lines of rescue treatments directed to resistant variants (Delgado et al., 2001; Pires et al., 2004; Lama et al., 2006; Teixeira et al., 2006; Pérez et al., 2007; Ríos et al., 2007; Vasehus Madsen et al., 2008).

<sup>☆</sup> Sequences have been deposited in GenBank under accession numbers FJ713155–FJ713290. The data will be released upon publication.

\* Corresponding author. Tel.: +34 91 8223900; fax: +34 91 5097014.

E-mail address: [mthomson@isciii.es](mailto:mthomson@isciii.es) (M.M. Thomson).

In Panama, 8486 AIDS cases, of which 335 are pediatric (<15 years of age), have been reported from September 1984 through September 2007. The estimated prevalence of HIV-1 infection is 1.0%, corresponding to the second highest prevalence in Central America after Belize (Ministry of Health, National Program on HIV and AIDS and UNAIDS, Panama, 2008; UNAIDS, 2009). The transmission routes are distributed as follows: sexual in 69.3%, perinatal in 3.4%, blood transfusion in 1.6%, and not available in 25.6%. Among sexually acquired infections, 75% correspond to heterosexual transmission, 19% to homosexual men, and 6% to bisexual men (Ministry of Health, National Program on HIV and AIDS, and UNAIDS, 2008). Until September 2007, the annual incidence rate was 12.1/100,000 inhabitants, with the highest rates in the most densely populated areas (Colon Province 41.6, Metropolitan Area of Panama Province 40.7, San Miguelito District 29.3, and the Eastern Districts of Panama Province 25.5) (Ministry of Health, National Program on HIV and AIDS, and UNAIDS, 2008).

In 1999, the Social Security System of Panama began to provide highly active antiretroviral therapy (HAART) for beneficiary patients, and in 2001 the Ministry of Health extended HAART coverage to the rest of HIV-1-infected individuals (Ministry of Health, STD/HIV/AIDS National Program, 2002; Ministry of Health, National Program on HIV and AIDS, and UNAIDS, 2008). The therapy is based mainly in the combination of two nucleoside or non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTI or NNRTI) plus one protease inhibitor (PI) (Ministry of Health, STD/HIV/AIDS National Program, Panama, 2002). The introduction of HAART resulted in a decrease in AIDS mortality and opportunistic infections. Until 2007, a total of 3994 AIDS patients (adults and children) from Panama had received HAART (Ministry of Health, National Program on HIV and AIDS, and UNAIDS, 2008).

Sequence analysis of HIV-1 *pol* gene provides important information on ARV drug resistance-associated mutations affecting the susceptibility of HIV-1 strains to protease (PR) and RT inhibitors and on subtype diversity (Delgado et al., 2001; Pires et al., 2004; Ríos et al., 2007). HIV-1 genetic diversity in Panama was previously examined in *gag* (p17) and *env* (C2–C4) genes (Ahumada-Ruiz et al., 2008). However, no studies on HIV-1 *pol* gene describing the epidemiology of genotypic drug resistance or phylogenetic relationships have been reported. Here we report the first study on the prevalence of ARV drug resistance-associated mutations and on genetic diversity in *pol* sequences in AIDS patients and drug-naïve asymptomatic HIV-1-infected individuals from Panama.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Patients and samples

Blood samples were obtained from 82 AIDS patients and 53 asymptomatic drug-naïve HIV-1-infected individuals from the largest medical centers of the Panamanian health system, Complejo Hospitalario Dr. Arnulfo Arias Madrid, Caja del Seguro Social de Panamá (CSS), and Hospital Santo Tomás (HST). All samples were collected in 2004 and 2005. Of 135 samples, 109 (80.7%) were from men and 26 (19.3%) were from women. With regard to transmission routes, all patients were infected via sexual contact. Risk exposures were 73 (54.1%) heterosexual, 17 (12.6%) homosexual, 3 (2.2%) bisexual, and 42 unspecified. The distribution of geographic areas of sample collection was 59 Panama District, 28 San Miguelito District, 19 Arraiján District, 7 Colón Province, 5 La Chorrera District, 2 Capiarra District, and 1 each Chepo District, Coclé Province, Veraguas Province, Chiriquí Province, Bocas del Toro Province, and Comarca Kuna Yala; for 9 samples, data on place

of sample collection was not available. To analyze geographical correlations of samples within phylogenetic clusters, two areas were considered, separated by the Panama Canal: East Panama, comprising Panama, San Miguelito, and Chepo Districts, Colón Province, and Comarca Kuna Yala; and West Panama, comprising Arraiján, Capiarra, and La Chorrera Districts, and Coclé, Veraguas, and Chiriquí Provinces.

### 2.2. RNA isolation, amplification and sequencing

Viral RNA was extracted from 200 µl of plasma with Magna Pure LC Automated Nucleic Acid Extraction System (Roche, Mannheim, Germany), following the manufacturer's instructions. An HIV-1 *pol* fragment comprising the entire protease and 978 nucleotides (nt) of the RT coding region was amplified by reverse transcription coupled with PCR, followed by nested PCR, from plasma RNA using an in-house method (Villahermosa et al., 2000). Direct sequencing in PR and RT coding regions was done with ABI Prism BigDye Terminator Kit and ABI PRISM 3700 automated sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA).

### 2.3. Phylogenetic analyses

The sequence electropherograms were assembled with SeqMan (DNASTar, Madison, WI), and manually aligned using BioEdit (Tom Hall, <http://www.mbio.ncsu.edu/Bioedit/bioedit.html>). Neighbour-joining (NJ) trees, based on Kimura's 2-parameter distances, were constructed using MEGA v. 3.1 (Kumar et al., 2004). The reliability of tree topologies was assessed by bootstrapping with 1000 replicates. Phylogenetic trees were also constructed using Bayesian inference with MrBayes v. 3.1 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001), using the general time reversible nucleotide substitution model, with gamma-distributed among-site rate heterogeneity and a proportion of invariable sites (GTR +  $\Gamma$  + I). For each dataset, two simultaneous independent runs were performed, with eight chains, sampling every 500 generations. The analyses were run until both runs had reached convergence, as determined by an average standard deviation of split frequencies <0.01. Node support was derived from a majority-rule consensus of trees sampled from the posterior distribution, discarding the first 50% as burn-in.

Recombination analyses were performed with bootscanning using Simplot v. 3.5.1 (Lole et al., 1999). In these analyses, windows of 300 nucleotides were used moving in 20 nt increments; phylogenetic trees were constructed with the NJ method, using Kimura's 2-parameter distances, with the transition/transversion ratios estimated from the dataset.

The dates of the most recent common ancestors (MRCA) of phylogenetic clusters were estimated using a Bayesian Markov Chain Monte Carlo (MCMC) method as implemented in BEAST v. 1.4 (Drummond and Rambaut, 2007). Since evolutionary rates could not be estimated directly from the sequences of Panama, because samples were collected over a relatively narrow time span, the analysis was performed using mutation rates previously calculated for the same HIV-1 *pol* segment (Hué et al., 2005) applying a constant molecular clock. The substitution model employed for the analysis was GTR +  $\Gamma$  + I. Each MCMC chain was run for 80 million states and sampled every 100,000 states, with the first 10% discarded as burn-in. MCMC convergence and effective sample sizes were checked using the program Tracer v. 1.4 (available at <http://tree.bio.ed.ac.uk>).

### 2.4. Antiretroviral drug resistance analysis

PR-RT sequences were analyzed for antiretroviral resistance-associated mutations with the HIVdb program at the Stanford

University High Drug Resistance Database (Rhee et al., 2003; <http://hivdb.stanford.edu>). At ambiguous sequence positions (due to a mixed virus population), a drug resistance-associated mutation was assumed if present in the mixture.

### 2.5. Statistical analyses

Statistical correlations of phylogenetic clusters with geographical area or transmission route were analyzed with Fisher's exact test.

## 3. Results

### 3.1. Phylogenetic diversity of HIV-1 in Panama

The phylogenetic analysis of HIV-1 *pol* sequences from Panama revealed that 133 (98.5%) of 135 sequences, including 80 (97%) of 82 AIDS patients and all 53 (100%) asymptomatic individuals, were infected with subtype B viruses, and the two remaining AIDS patients harboured viruses clustering with references of CRF12\_BF and sub-subtype A3, respectively (Fig. 1). Bootscan analyses of the two non-subtype B viruses showed that the one clustering with A3 references corresponded to a CRF02\_AG/A3 recombinant, with PR mainly of CRF02\_AG and RT of sub-subtype A3, and the one clustering with CRF12\_BF corresponded to a CRF12\_BF/B secondary recombinant, with PR mainly of CRF12\_BF and RT recombinant between subtype B and CRF12\_BF (Fig. 2).

When analyzing the sequences with a Bayesian phylogeny inference method, 5 clusters of  $\geq 5$  sequences were identified within subtype B, which together comprised 87 (65.4%) of 133 subtype B viruses. Clusters were designated B-PA1 ( $n = 42$ ), B-PA2 ( $n = 15$ ), B-PA3 ( $n = 14$ ), B-PA4 ( $n = 10$ ), and B-PA5 ( $n = 6$ ) (Fig. 3). Clusters B-PA2, B-PA4 and B-PA5 were supported by a posterior probability (PP) of 1.0, and clusters B-PA1 and B-PA3 by PP of 0.89 and 0.90, respectively. These increased to 1.0 and 0.96, respectively, when the analysis was done after removal of sequences branching as outliers of these clusters. Cluster B-PA1 was significantly associated with East Panama and clusters B-PA2 and B-PA4 with West Panama ( $p < 0.05$ , Fisher's exact test) (Table 1). No significant association between any of the clusters and transmission routes was found. A Bayesian coalescent analysis indicates that the MRCA of the 4 largest clusters are dated in the 1980s (mean dates 1985–1987), and that of the 5th cluster in the early 1990s (Table 2).

### 3.2. Antiretroviral drug resistance-associated mutations

ARV drug resistance-associated mutations were detected in 8 (6%) individuals, all of them AIDS patients with previous exposure to antiretroviral drugs. The distributions of ARV drug resistance-

**Table 2**

Estimated times of origin of subtype B clusters of Panama.

Cluster	No. of sequences	tMRCA <sup>a</sup>
B-PA1	42	1986.5 (1983.5–1989.4)
B-PA2	15	1987.7 (1985–1990.6)
B-PA3	14	1987.5 (1984.9–1989.7)
B-PA4	10	1985.3 (1982.2–1988.3)
B-PA5	6	1990.8 (1988.2–1993.4)

<sup>a</sup> Time of the most recent common ancestor. The data represent calendar years, with the mean values and, in parentheses, the 95% highest posterior density (HPD) confidence intervals. The analysis was performed with BEAST (Drummond and Rambaut, 2007).

**Table 3**

Antiretroviral drug resistance-associated mutations in AIDS patients.

Patient ID	ARV treatment and year of beginning	Drug resistance mutations <sup>a</sup>		
		NRTI	NNRTI	PI
PA_10	AZT/3TC, 1998 d4T/ddI/NFV, 2000 AZT/3TC/EFV, 2004	T215F		D30N N88D
PA_14	AZT/3TC/EFV, 2004	M184V	K103N	
PA_23	AZT/3TC/IDV, 2000 d4T/3TC/NFV, 2000	L74V T215Y	L100I K103N	D30N V82A N88D L90M
PA_39	AZT/3TC, 2004			L90M
PA_47	AZT/3TC, 1998 d4T/ddI/NFV, 1999	L74V T215Y		D30N N88D
PA_59	AZT/3TC/IDV, 2005		K103N	
PA_68	AZT/3TC/EFV, 2005		Y318F	
PA_75	AZT/3TC/EFV, 2004		K103N	

<sup>a</sup> Only those mutations associated with high or intermediate resistance according to the Stanford Database Program (<http://hivdb.stanford.edu/>) are shown.

associated mutations were as follows: one patient with resistance to PI, three to NNRTI, two to PI + NRTI, one to NRTI + NNRTI, and one to all three drug classes. The resistance mutations detected in the eight AIDS patients were consistent with their treatment regimens, except for two patients (PA\_23 and PA\_59). No ARV resistance-associated mutations were identified in the drug-naïve individuals. A complete list of ARV drug resistance-associated mutations that were found is shown in Table 3.

## 4. Discussion

In this study, phylogenetic and antiretroviral resistance analyses were combined in partial *pol* sequences from 135 HIV-1-infected subjects from Panama.

**Table 1**

Distribution of subtype B clusters of Panama according to geographical area and risk exposure.

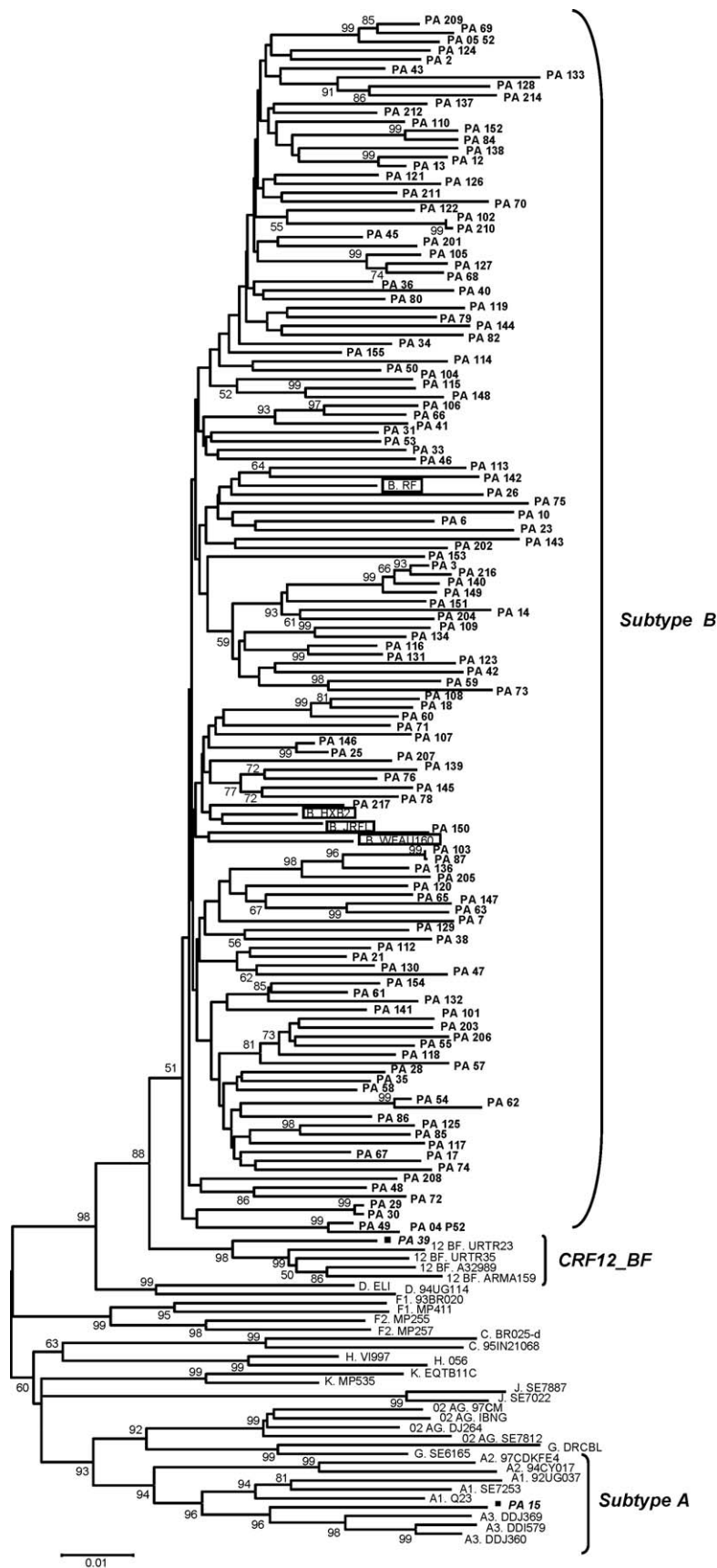
Cluster	Geographical area					Risk exposure				
	East Panama		West Panama		Unknown	Heterosexual		Homosexual		Unknown
	<i>n</i>	% <sup>a</sup>	<i>n</i>	% <sup>a</sup>		<i>n</i>	% <sup>a</sup>	<i>n</i>	% <sup>a</sup>	
B-PA1 <sup>b</sup>	38	95	2	5	2	25	81	6	19	11
B-PA2 <sup>b</sup>	6	40	9	60	0	6	86	1	14	8
B-PA3	9	69	4	31	1	5	55.5	4	44.4	5
B-PA4 <sup>b</sup>	4	40	6	60	0	4	67	2	33	4
B-PA5	5	83.3	1	16.7	0	4	100	0	0	2
Total subtype B <sup>c</sup>	95	76.6	29	23.4	9	71	78	20	23.1	42

<sup>a</sup> Percentages were calculated using only samples with known location of residence and risk exposures, respectively.

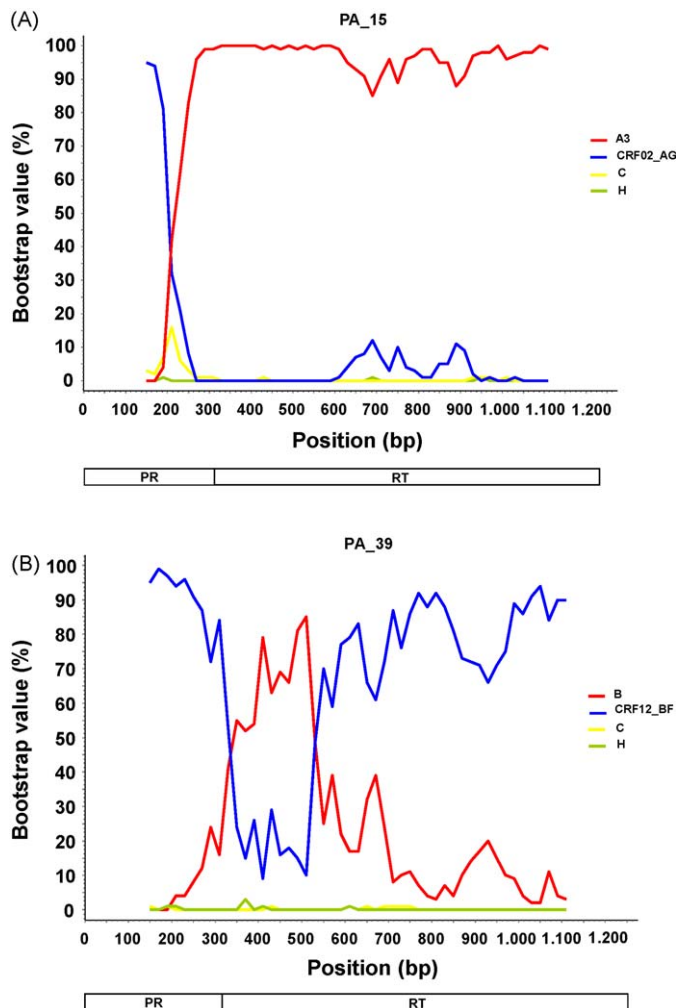
<sup>b</sup> Associations of clusters with East (B-PA1) or West (B-PA2 and B-PA4) Panama are statistically significant ( $p < 0.05$ , Fisher's exact test).

<sup>c</sup> Includes all subtype B samples in this study.





**Fig. 1.** Neighbour-joining phylogenetic tree of PR-RT sequences from Panama. Names of viruses from Panama start with PA and are in bold type. Names of subtype B references are boxed. The two non-subtype B viruses of Panama are marked with black squares. Names of HIV-1 clades comprising Panamanian viruses are indicated on the right of the corresponding brackets. Only bootstrap values 50% or higher are shown.



**Fig. 2.** Bootscan analyses of recombinant viruses from Panama. A window of 300 nt was used moving in 20 nt increments. The horizontal axis represent the nt position of the window's midpoint from the 5' end of PR, and the vertical axis represents % bootstrap support for clustering with the reference sequences within each window. (A) Analysis of PA<sub>15</sub>. In an initial analysis, references of all subtypes, and CRF02\_AG and sub-subtype A3 (with which PA<sub>15</sub> clustered in phylogenetic trees of *gag* and *pol*, respectively) were used for the analysis; a subsequent analysis (shown in the figure) was done using only those references (A3 and CRF02\_AG) clustering with PA<sub>15</sub> with  $\geq 70\%$  bootstrap value at some segment in the initial bootscan analysis, and subtypes C and H as outgroups. (B) Analysis of PA<sub>39</sub>. In an initial analysis, references of all subtypes and CRF12\_BF (with which PA<sub>39</sub> clustered in phylogenetic trees of *gag* and *pol*) were used for the analysis; a subsequent analysis (shown in the figure) was done using only those references (B and CRF12\_BF) clustering with PA<sub>39</sub> with  $\geq 70\%$  bootstrap value in the initial analysis, and subtypes C and H as outgroups.

The phylogenetic analyses revealed that 80 (97%) of 82 AIDS patients and all 53 (100%) asymptomatic subjects harboured subtype B viruses (Fig. 1). Two AIDS patients harboured recombinant viruses, CRF02\_AG/A3 and CRF12\_BF/B, respectively (Fig. 2).

The predominance of HIV-1 subtype B found in Panama is concordant with reports derived from neighboring countries such as Honduras, Mexico, Colombia and Venezuela, where subtype B is the major clade (Delgado et al., 2001; Rivera-Morales et al., 2001; Eyazguirre et al., 2006; Lama et al., 2006; Ríos et al., 2007; Lloyd et al., 2008), and with a previous study in Panama based on the analysis of *gag* (p17) and *env* (C2–C4) genes (Ahumada-Ruiz et al., 2008). In the last study, the high genetic distance between Panamanian HIV-1 strains suggested that the HIV-1 epidemic in Panama has a long time of evolution. This observation is consistent

with the report of the first AIDS case in Panama in 1984 (Ministry of Health, National Program on HIV and AIDS, and UNAIDS, 2008).

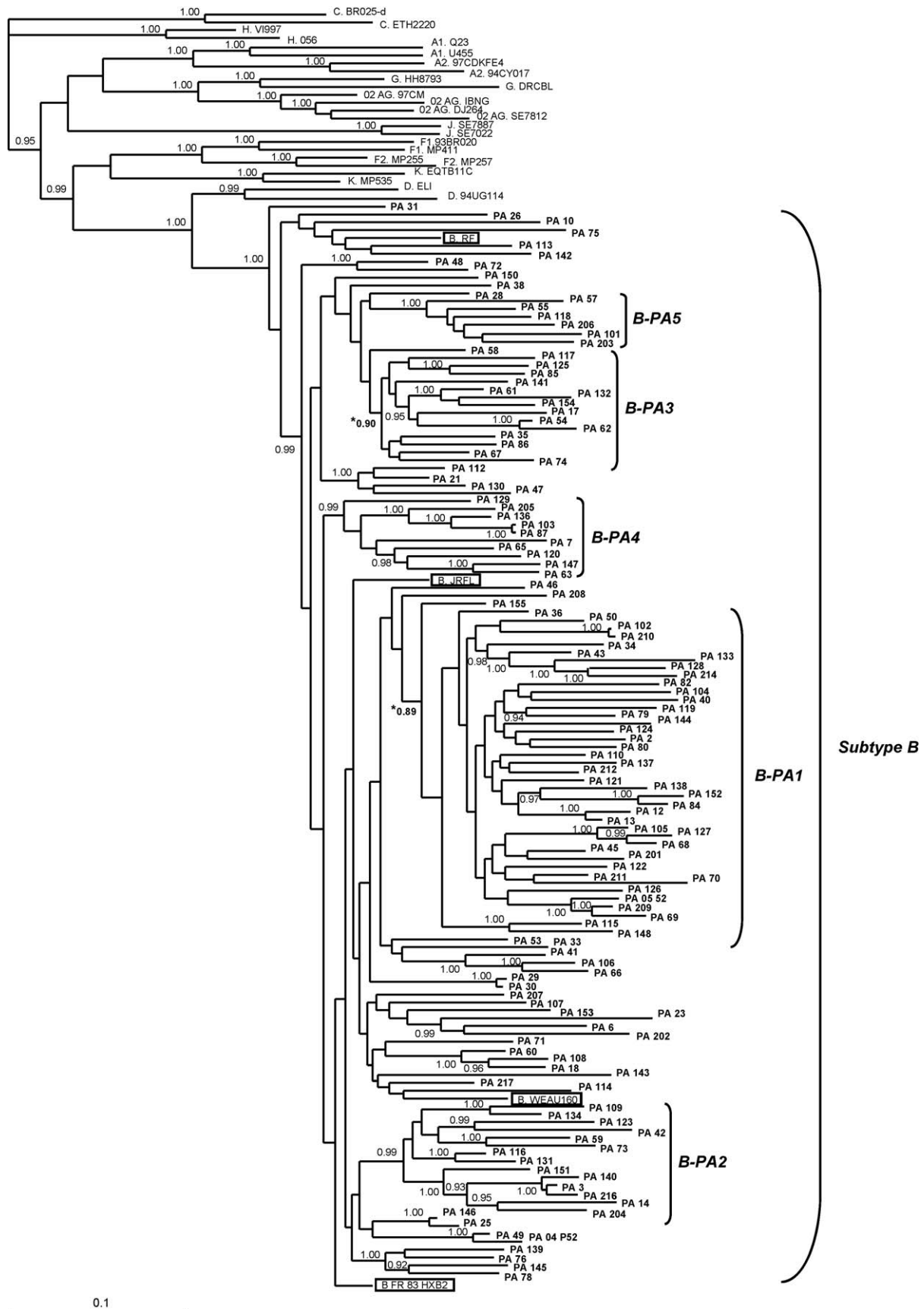
In the present study, the existence of 5 strongly supported monophyletic clusters within subtype B has been recognized for the first time by using a Bayesian phylogeny inference method. Nearly two thirds of Panamanian subtype B viruses branched within one of these clusters, designated B-PA1 to B-PA5. To analyze geographic correlations of the clusters, Panama was divided in two regions, East and West, using the Panama Canal as the separation line. Three clusters (B-PA1, B-PA2, and B-PA4) were correlated to a geographical area (Table 1). However, no statistically significant correlation between any of the clusters and risk exposure (heterosexual vs. homo- or bisexual) was found. A Bayesian coalescent analysis suggests that these clusters are relatively old, with estimates for the origin of the four largest clusters in the 1980s, and that of the fifth in the early 1990s.

The existence of HIV-1 intraclade phylogenetic clusters, in some cases with epidemiological or geographical correlations, has been reported previously in other countries, including Cuba (subtype B), Brazil (subtype B), Ethiopia (subtype C), and Russia (subtype A) (Thomson and Nájera, 2005; Pérez et al., 2006; Thomson et al., 2009). These clusters may derive from multiple introductions of an HIV-1 subtype or CRF or may reflect the existence of multiple active transmission networks in a country or region. In the case of Panama, a Bayesian analysis suggests an old origin of the clusters, which may support a scenario of multiple subtype B introductions in the country at the onset of epidemic. An alternative possibility is that the clusters reflect the establishment of diverse local transmission networks early in the HIV-1 epidemic in Panama. Those sequences branching outside of the major clusters may represent either separate introductions or intrasubtype (inter-cluster) recombinant viruses. Our preliminary analyses of near full-length genomes (unpublished data) further support the existence of the clusters here identified, and have allowed the identification of intrasubtype B recombinant viruses. Further work will be required to investigate possible biological correlations of the clusters, including susceptibility to immune responses, which may be relevant for the design of vaccines.

Bootscan analyses identified two AIDS patients with recombinant viruses (Fig. 2). The first, PA<sub>15</sub>, clustered in PR with CRF02\_AG and in RT with sub-subtype A3. The second, PA<sub>39</sub>, clustered in PR with CRF12\_BF and in RT with subtype B (5' segment) and CRF12\_BF (3' segment). In a previous study in Panama which included these same samples using *gap* and *env* segments, PA<sub>15</sub> grouped with CRF02\_AG and PA<sub>39</sub> with CRF12\_BF in both regions (Ahumada-Ruiz et al., 2008). The bootscan analyses suggest that both samples correspond to unique recombinant forms, but characterization of full length genome sequences will be required to fully determine the recombination profile.

The CRF02\_AG and sub-subtype A3 predominates in West and Central African countries (Meloni et al., 2004; Delgado et al., 2008). However, the sporadic presence of CRF02\_AG has been reported recently in Ecuador, Brazil and Cuba (Carrión et al., 2003; Eyer-Silva and Morgado, 2007; Pérez et al., 2007). CRF12\_BF has been reported in countries of South America such as Argentina, Uruguay and Chile (Thomson et al., 2000, 2002b; Carr et al., 2001; Ríos et al., 2007). Travel-associated infections from different categories contribute to an increase in HIV diversity, as recently observed in countries such as Cuba (Thomson and Nájera, 2001; Pérez et al., 2006).

The genotypic drug resistance analyses revealed that 8 (9.7%) AIDS patients and no drug-naïve individuals harbored mutations conferring high or intermediate resistance levels to ARV drugs (Table 3). These figures are lower than those reported in similar studies in Latin America. Thus, in Chile the prevalence of high or



**Fig. 3.** Bayesian phylogenetic tree of PR-RT subtype B sequences from Panama. Names of viruses from Panama start with PA and are in bold type. Names of subtype B references are boxed. Only node posterior probabilities  $\geq 0.90$  are shown, except for cluster B-PA1 ( $PP = 0.89$ ). Panamanian subtype B cluster names are indicated on the right of the corresponding brackets. \*For clusters B-PA1 ( $PP = 0.89$ ) and B-PA3 ( $PP = 0.90$ ), the node posterior probabilities increased to 1.00 and 0.96, respectively, when sequences PA\_46 and PA\_208, branching as outliers of cluster B-PA1, and PA\_58, branching as outlier of cluster B-PA3, were removed in a subsequent analysis.



intermediate resistance level was 77% among 66 ARV drug-treated subjects and 2.5% among 79 drug-naïve individuals (Ríos et al., 2007). In Venezuela the prevalence of resistance to RT inhibitors was 26% in ARV treated patients and 3% in drug-naïve individuals (Delgado et al., 2001). In Peru, the prevalences of ARV drug resistance mutations were 31.3% among treated patients and 3.3% among drug-naïve individuals (Lama et al., 2006). The only data on HIV-1 drug resistance in Central America is from a study in Honduras in 2008, where the drug resistance prevalence was 9.2% among drug-naïve individuals (Lloyd et al., 2008).

The low prevalence of ARV drug mutations in AIDS patients of Panama may derive from the relatively short time elapsed from generalization of ARV drug therapy in Panama until time of sample collection for this study. Differences with other countries may also derive from differences in the degree of adherence to the therapeutic regimens. Failure to detect drug resistance mutations among 53 drug-naïve individuals might suggest that it may not be necessary at present to routinely test for drug resistance prior to the start of ARV drug treatment in Panama. However, since this may change in the future, it is important to continue the epidemiologic surveillance of ARV drug resistance in Panama.

In PA\_14 sample, the T215S mutation was detected. The T215S/C/D/E/I/V/A/N mutations represent reversions from the NRTI resistance mutation T215Y. Most of these mutations do not reduce NRTI susceptibility, but their presence suggests that a resistant virus may have been transmitted (Goudsmit et al., 1996). In this patient, the sample collection and the start of the ARV therapy was in the same month, which suggest that the T215S mutation might derive from a transmitted virus.

In two samples (PA\_23 and PA\_59) NNRTI resistance mutations were detected. However, both patients reportedly were never treated with NNRTI drugs. This finding suggests the possibility of reinfection with viruses with NNRTI resistance mutations (Table 3).

In conclusion, this is the first study on HIV-1 *pol* gene in Panama, analyzing genetic diversity and ARV drug resistance among treated and drug-naïve individuals. Only subtype B was found to be circulating in Panama, although sporadic recombinant viruses (CRF02\_AG/A3 and CRF12\_BF/B) were identified. Drug resistance mutations were detected in 9.7% AIDS patients and revealed the presence of acquired mutations to ARV drugs. This information data may be relevant for the management of patients and for implementing prophylactic measures to prevent increases in acquired resistance mutations. Finally, we identified for the first time 5 phylogenetic intrasubtype clusters comprising the majority of subtype B viruses, with the origin of 4 of the largest clusters estimated in the 1980s, which suggests either multiple HIV-1 subtype B introductions, or the establishment, early in the epidemic, of local transmission networks, which gave rise to most current HIV-1 infections in Panama.

## Acknowledgments

The authors thank all patients who participated in this study. We also gratefully acknowledge all the physicians and nurses at the CSS and HST who contributed to the collection of samples. We also thank Dr. Moisés Espino, Miss Esther Puga (CSS), Dr. Rigoberto Samaniego and Dr. Antonio Torres (HST) for their invaluable collaboration. We are also grateful to Pablo Martínez, Aurora de Miguel, and Ana Parejo of the Genomic Unit, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain, for technical assistance in sequencing. Sara Ahumada Ruiz was supported through a fellowship from the Government of Panama.

## References

- Ahumada-Ruiz, S., Casado, C., Toala-González, I., Flores-Figueroa, D., Rodríguez-French, A., López-Galíndez, C., 2008. High divergence of HIV-1 subtype B viruses from Panama. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 24, 1461–1466.
- Carrión, G., Hierholzer, J., Montano, S., Alava, A., Pérez, J., Guevara, A., Laguna-Torres, V., Mosquera, C., Russell, K., Cruz, C., Chauca, G., Kochel, T., Bix, D.L., Sanchez, J.L., Carr, J.K., 2003. Circulating recombinant form CRF02\_AG in South America. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 19, 329–332.
- Carr, J.K., Ávila, M., Gómez Carrillo, M., Salomon, H., Hierholzer, J., Watanaveeradej, V., Pando, M.A., Negrete, M., Russell, K.L., Sanchez, J., Bix, D.L., Andrade, R., Vinales, J., McCutchan, F.E., 2001. Diverse BF recombinants have spread widely since the introduction of HIV-1 into South America. *AIDS* 14, 41–47.
- Delgado, E., León-Ponte, M., Villahermosa, M.L., Cuevas, M.T., Deibis, L., Echevarría, G., Thomson, M., Pérez-Álvarez, L., Osmanov, S., Nájera, R., 2001. Analysis of HIV type 1 protease and reverse transcriptase sequences from Venezuela for drug resistance-associated mutations and subtype classification: a UNAIDS study. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 17, 753–758.
- Delgado, E., Ampofo, W., Sierra, M., Torpey, K., Pérez-Álvarez, L., Bonney, E., Mukadi, Y., Lartey, M., Nyarko, C., Amenyah, R., Thomson, M., Nájera, R., 2008. High prevalence of unique recombinant forms of HIV-1 in Ghana: molecular epidemiology from antiretroviral resistance study. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 48, 599–606.
- Drummond, A.J., Rambaut, A., 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol. Biol.* 7, 214.
- Eyer-Silva, W.A., Morgado, M.G., 2007. Autochthonous horizontal transmission of a CRF02\_AG strain revealed by a human immunodeficiency virus type 1 diversity survey in a small city in inner state of Rio de Janeiro, Southeast Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102, 809–815.
- Eyzaguirre, L., Bautista, C.T., Ayala, C., Acosta, J., Negrete, M., Saterén, W., Montano, S., Sánchez, J., Carr, J., 2006. First case of HIV Type 1 subtype F among men who have sex with men in Colombia. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 22, 808–811.
- Goudsmit, J., De Ronde, A., Ho, D.D., Perelson, A.S., 1996. Human immunodeficiency virus fitness in vivo: calculations based on a single zidovudine resistance mutation at codon 215 of reverse transcriptase. *J. Virol.* 70, 5662–5664.
- Hué, S., Pillay, D., Clewley, J.P., Pybus, O., 2005. Genetic analysis reveals the complex structure of HIV-1 transmission within defined risk groups. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 4425–4429.
- Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F., 2001. *Bioinformatics* 17, 754–755.
- Kijak, G., McCutchan, F., 2005. HIV diversity, molecular epidemiology, and the role of recombination. *Curr. Inf. Dis. Rep.* 7, 480–488.
- Kumar, S., Tamura, K., Nei, M., 2004. MEGA 3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform.* 5, 150–163.
- Lama, J., Sanchez, J., Suarez, L., Caballero, P., Laguna, A., Sánchez, J., Whittington, W., Celum, C., Grant, R., for the Peruvian HIV sentinel surveillance working group, 2006. Linking HIV and antiretroviral drug resistance surveillance in Peru: a model for a third generation HIV sentinel surveillance. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 42, 501–505.
- Lole, K.S., Bollinger, R.C., Paranjape, R.S., Gadkaeri, D., Kulkarni, S.S., Novak, N.G., Ingersoll, R., Sheppard, H.W., Ray, S.C., 1999. Full length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *J. Virol.* 73, 152–160.
- Los Alamos HIV Sequence Database. Available at: <http://hiv-web.lanl.gov>.
- Lloyd, B., O'Connell, R., Michael, N., Aviles, R., Palou, E., Hernández, R., Cooley, J., Jagodzinski, L., 2008. Prevalence of resistance mutations in HIV-1 infected Hondurans at the beginning of the national antiretroviral therapy program. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 24, 529–535.
- Meloni, S.T., Kim, B., Sankalé, J.L., Hamel, D., Tovanabutra, S., Mboup, S., McCutchan, F., Kanki, P., 2004. Distinct human immunodeficiency virus type 1 subtype A virus circulating in West Africa: sub-subtype A3. *J. Virol.* 78, 12438–12445.
- Ministry of Health, STD/HIV/AIDS National Program, 2002. Guide to Care for People Living with HIV and AIDS. Panama.
- Ministry of Health, National Program on HIV and AIDS, and UNAIDS, 2008. National Report on the Progress Made in the Implementation of UNGASS-Panama. Available at: [http://data.unaids.org/pub/Report/2008/panama\\_2008\\_country\\_progress\\_report\\_sp\\_es.pdf](http://data.unaids.org/pub/Report/2008/panama_2008_country_progress_report_sp_es.pdf).
- Nájera, R., Delgado, E., Pérez-Álvarez, L., Thomson, M., 2002. Genetic recombination and its role in the development of the HIV-1 pandemic. *AIDS* 16 (Suppl. 4), S3–S16.
- Pérez, L., Thomson, M., Bleda, M., Aragonés, C., González, Z., Pérez, J., Sierra, M., Casado, G., Delgado, E., Nájera, R., 2006. HIV type 1 molecular epidemiology in Cuba: high genetic diversity, frequent mosaicism, and recent expansion of BG intersubtype recombinants form. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 22, 724–733.
- Pérez, L., Pérez-Álvarez, L., Carmona, R., Aragonés, C., Delgado, E., Thomson, M., González, Z., Contreras, G., Pérez, J., Nájera, R., 2007. Genotypic resistance to antiretroviral drugs in patients infected with several HIV type 1 genetic forms in Cuba. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 23, 407–414.
- Pires, I., Soares, M., Speranza, F., Ishii, S., Vieira, M., Gouvea, M., Guimaraes, M., Oliveira, F., Magnanini, M., Brindeiro, R., Tanuri, A., 2004. Prevalence of human immunodeficiency virus drug resistance mutations and subtypes in drug-naïve, infected individuals in the army health service of Rio de Janeiro, Brazil. *J. Clin. Microbiol.* 42, 426–430.

- Rhee, S.Y., Gonzales, M.J., Kantor, R., Betts, B.J., Ravela, J., Shafer, R.W., 2003. Human immunodeficiency virus reverse transcriptase and protease sequence database. *Nucl. Acids Res.* 31, 298–303.
- Ríos, M., Delgado, E., Pérez-Álvarez, A., Fernández, J., Gálvez, P., Vázquez de Parga, E., Yung, V., Thomson, M., Nájera, R., 2007. Antiretroviral drug resistance and phylogenetic diversity of HIV-1 in Chile. *J. Med. Virol.* 79, 647–656.
- Rivera-Morales, L.G., Novitsky, V.A., Trujillo, J.R., Lavalle-Montalvo, C., Cano-Domínguez, C., Ramos-Jiménez, J., Jiménez-Ríos, E., Flores-Flores, L., López-Guillén, P., Gilbert, P., Vannberg, F., Tamez-Guerra, R., Rodríguez-Padilla, C., Essex, M., 2001. The molecular epidemiology of HIV Type-1 of men in Mexico. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 17, 87–92.
- Teixeira, S., Bastos, F., Hacker, M., Lindenmeyer Guimaraes, M., Gonclaves Morgado, M., 2006. Trends in drug resistance mutations in antiretroviral-naïve intravenous drugs users of Rio de Janeiro. *J. Med. Virol.* 78, 764–769.
- Thomson, M., Nájera, R., 2001. Travel and the introduction of human immunodeficiency virus type 1 non-B subtype genetics forms into western countries. *Clin. Infect. Dis.* 32, 1732–1737.
- Thomson, M., Nájera, R., 2005. Molecular epidemiology of HIV-1 variants in the global AIDS pandemic: an update. *AIDS Rev.* 7, 210–224.
- Thomson, M., Villahermosa, M.L., Vázquez de Parga, E., Cuevas, M.T., Delgado, E., Manjón, N., Medrano, L., Pérez-Álvarez, L., Contreras, G., Carrillo, M.G., Salomón, H., Nájera, R., 2000. Widespread circulation of a B/F intersubtype recombinant form among HIV-1 infected individuals in Buenos Aires, Argentina. *AIDS* 14, 897–899.
- Thomson, M., Pérez-Álvarez, L., Nájera, R., 2002a. Molecular epidemiology of HIV-1 genetic forms and its significance for vaccine development and therapy. *Lancet Infect. Dis.* 2, 461–471.
- Thomson, M., Delgado, E., Herrero, I., Villahermosa, M.L., Vázquez de Parga, E., Cuevas, M.T., Carmona, R., Medrano, L., Pérez-Álvarez, L., Cuevas, L., Nájera, R., 2002b. Diversity of mosaic structures and common ancestry of human immunodeficiency virus type 1 BF intersubtype recombinant viruses from Argentina revealed by analysis of near full length genome sequences. *J. Gen. Virol.* 83, 107–119.
- Thomson, M., Vinogradova, A., Delgado, E., Rakhmanova, A., Yakovlev, A., Cuevas, M.T., Muñoz, M., Pinilla, M., Vega, Y., Pérez-Álvarez, L., Osmanov, S., Nájera, R., 2009. Molecular epidemiology of HIV-1 in St. Petersburg, Russia: predominance of subtype A, former Soviet Union variant, and identification of intrasubtype subclusters. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 51, 332–339.
- UNAIDS, 2009. AIDS Epidemic Update. Available at: <http://www.unaids.org/en/CountryResponses/Countries/default.asp>.
- Vasehus Madsen, T., Lohse, N., Stilling Jensen, E., Obel, N., Ladefoged, K., Gerstoft, J., Petersen, A., Nielsen, A., Jorgensen, L., 2008. High prevalence of drug resistant human immunodeficiency virus type 1 in treatment naïve patients in Greenland. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 24, 1073–1077.
- Villahermosa, M.L., Thomson, M., Vázquez de Parga, E., Cuevas, M.T., Contreras, G., Pérez-Álvarez, L., Delgado, E., Manjón, N., Medrano, L., Nájera, R., 2000. Improved conditions for extraction and amplification of human immunodeficiency virus type 1 RNA from plasma samples with low viral load. *J. Hum. Virol.* 3, 27–34.